



Multidisciplinary approach of the *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* symbiosis

Adeline Renier

► To cite this version:

Adeline Renier. Multidisciplinary approach of the *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* symbiosis. Biologie végétale. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2008. Français. NNT : . tel-00343650

HAL Id: tel-00343650

<https://theses.hal.science/tel-00343650>

Submitted on 2 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

**Discipline : Biologie Intégrative des plantes
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences et Environnement**

Présentée et soutenue publiquement le 18 janvier 2008

Par

Adeline RENIER

Titre :

Approche pluridisciplinaire de la symbiose

Methylobacterium nodulans / Crotalaria podocarpa

JURY

**M. Bruno TOURAINÉ
M. Philippe NORMAND
M. Stéphane VUILLEUMIER
M. Charles ROSENBERG
Mlle Sylvie RAPIOR
M. Bernard DREYFUS**

**Professeur, Université Montpellier II
Directeur de Recherche CNRS, Lyon
Professeur, Université Strasbourg
Directeur de Recherche INRA, Toulouse
Professeur, Université Montpellier I
Directeur de Recherche IRD, Montpellier**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
co-Directeur de thèse**

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

**Discipline : Biologie Intégrative des plantes
Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences et Environnement**

Présentée et soutenue publiquement le 18 janvier 2008

Par

Adeline RENIER

Titre :

Approche pluridisciplinaire de la symbiose

Methylobacterium nodulans / Crotalaria podocarpa

JURY

**M. Bruno TOURAINÉ
M. Philippe NORMAND
M. Stéphane VUILLEUMIER
M. Charles ROSENBERG
Mlle Sylvie RAPIOR
M. Bernard DREYFUS**

**Professeur, Université Montpellier II
Directeur de Recherche CNRS, Lyon
Professeur, Université Strasbourg
Directeur de Recherche INRA, Toulouse
Professeur, Université Montpellier I
Directeur de Recherche IRD, Montpellier**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
co-Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tenais à adresser mes remerciements au Pr. Bruno Touraine pour avoir accepté d'être président de ce jury de thèse, au Pr. Stéphane Vuilleumier et à Mr Philippe Normand pour avoir accepté de juger ce travail et tout autant à Mr Charles Rosenberg pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Bernard Dreyfus, directeur du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, de m'avoir accepté sur ce sujet, accueilli dans son laboratoire et permis de poursuivre l'aventure malgré les difficultés "administratives" rencontrées tout au long du parcours.

Un très grand merci à Sylvie Rapior, ma directrice de thèse. Je ne saurais trouver les mots pour te remercier de m'avoir tant appris pendant ces trois années : pour m'avoir guidé dans ce travail, formé en phytochimie, fait confiance en me proposant le poste d'ATER, enseigné ta rigueur scientifique, ton esprit de synthèse, te remercier très chaleureusement pour tes grandes qualités humaines, ta disponibilité et ton dynamisme sans pareil et ton soutien inconditionnel. Je sors de ces trois années grandie d'une formidable expérience scientifique et humaine et d'une amie.

Un très grand merci également à Philippe Jourand pour m'avoir soumis le sujet et fait confiance pour poursuivre ses travaux. J'ai énormément appris pendant ces quelques mois auprès de Philippe qui a su me guider dans mes premiers pas de cette grande aventure qui est une thèse. Même parti dans un autre hémisphère et sur d'autres sujets, nos discussions hebdomadaires voire quasi quotidiennes si besoin, instantanées ou décalées, m'ont permis de progresser dans mon travail et de rebondir à chaque difficulté rencontrée. Merci pour ta confiance et tes encouragements sans cesse renouvelés.

Je tiens particulièrement à remercier Lionel Moulin et Yves Prin, dans des domaines spécifiques à chacun, pour leur aide au fil de cette thèse dans l'interprétation et la mise en valeur des résultats obtenus.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Botanique, mon refuge pendant la rédaction, notamment Laurence, Annick et Pauline pour leurs conseils en microscopie et techniques chromatographiques, ainsi que l'équipe d'enseignement pour m'avoir accueillie et former pendant mon année d'ATER (en deuxième année de thèse, oui cherchez l'erreur). Je tire de cette expérience la confirmation de ma volonté d'enseigner et un regard neuf sur la flore et surtout sur mes nouveaux amis les champignons (macromycètes comestibles plus particulièrement)!

Un petit mot pour Laurie, comment ça « copine de roumegage » ?? moi du grand nord moi pas comprendre. Merci pour ton amitié, ta bonne humeur et ton soutien sans faille. J'ai pu compter sur toi du début (en ayant pensé à moi lorsque le sujet fut proposé) jusqu'à la fin (à savoir ma conduite chez l'imprimeur pour le manuscrit final) que dire de plus.

Et puis merci à toutes les personnes qui m'ont, tout au long dans ces trois années et 18 jours (oui encore désolée Laurie de ne pas avoir fait cela en 3 ans), exprimé leur sympathie et encouragements : Nathalie (oh oui un grand merci), le personnel du LSTM sans pouvoir ici tous vous citer... oh et puis si soyons fous ! Les proches d'abord, je veux dire par là ceux (enfin celles !) qui ont partagé le bureau, Laurie (oui encore une fois), Cécile et Céline (ooohh oui), Marie-Mathilde, Angèle, et puis si on sort de ce bureau, dans l'ordre des aiguilles d'une montre et en tenant compte des derniers aménagements, Jean-Claude, Lucette, hop on passe l'escalier, Christine, Eric (un grand merci pour ta confiance et l'opportunité de poursuivre avec vous), Joël, Odile, Brigitte, Yves (re), Fabienne (), Gilles, Agnieszka, Gisèle, Antoine, Marc, Lucie, Katia, Fatou, on passe la salle café, Clémence, Philippe, Antoine, Karine, Nico, Lionel (tu noteras que c'est avec joie que je te cite deux fois), et re les filles du bureau car partager cet espace trois ans avec vous fut un réel plaisir, et puis si on descend l'escalier, Laure, Naïma, Pierre, Joseph, et puis à quelques kilomètres Marc, Guilhem et à beaucoup de kilomètres Philippe, Michel, Marc, et en face, Monique R, Stéphane C et Philippe R, mes stagiaires Anne-Lise et Anne-Sophie, mais également et enfin Jasper Fforde (*), Sisymbre et Tutu la tortue pour des échappatoires jusqu'alors insoupçonnés....*

Enfin, je n'en serai sûrement pas là aujourd'hui sans l'aide et le soutien de Pierre et de mes parents, mes plus fidèles supporteurs, un plus que immense merci à vous.

SOMMAIRE

Introduction Générale	1
<hr/>	
Synthèse Bibliographique	5
<hr/>	
I. La symbiose rhizobium-Légumineuse	5
I.1. Les Légumineuses	5
I.2. Les bactéries fixatrices d'azote	7
I.3. La formation du nodule	9
I.3.1. La pré-infection	9
I.3.2. L'infection	9
I.3.3. Le développement du nodule	11
I.4. Nouvelles avancées sur la symbiose rhizobium-Légumineuse	11
 II. Aspects symbiotiques : le dialogue moléculaire	 13
II.1. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes de nodulation	14
II.2. Les gènes de nodulation et les facteurs Nod	16
II.2.1. Les gènes nod communs	17
II.2.2. Les gènes nod spécifiques	18
II.2.3. Sécrétion des Facteurs Nod	20
II.3. Les rôles et les interactions des flavonoïdes, des gènes nod et des facteurs Nod pour une symbiose réussie	21
II.3.1. Spécificité de symbiose	21
II.3.2. Rôle des flavonoïdes	
II.3.2.1. Reconnaissance des flavonoïdes par les rhizobia : la protéine NodD	22
II.3.2.2. Inducteurs des gènes de nodulation	23
II.3.3. Les facteurs Nod	25
II.3.3.1. Reconnaissance des facteurs Nod par la plante-hôte	25
II.3.3.2. Rôle des facteurs Nod dans la spécificité d'hôtes	27
II.4. Conclusion	29
 III. Etat d'avancement des connaissances sur la symbiose <i>Methylobacterium nodulans</i> – <i>Crotalaria podocarpa</i>	 30
III.1. Les Crotalaires	30
III.1.1. Utilisation des Crotalaires	31
III.1.2. Méthodes de cultures des Crotalaires	31
III.1.3. Crotalaires et substances naturelles	32
III.2. Les <i>Methylobacterium</i>	34
III.2.1. La méthylotrophie : une fonction métabolique particulière	35
III.2.2. La relation plante- <i>Methylobacterium</i>	36
III.2.2.1. Rôle dans la germination des graines	38
III.2.2.2. Rôle dans la croissance des plantes	38
III.2.2.3. Rôle dans le métabolisme azoté	38
III.3. Des bactéries méthylotrophes appartenant au genre <i>Methylobacterium</i> nodulent et fixent l'azote en symbiose avec des Légumineuses	39
III.3.1. La symbiose <i>Methylobacterium nodulans</i> / <i>Crotalaria podocarpa</i>	40
III.3.2. Autres souches de <i>Methylobacterium</i> entrant en symbiose avec des Légumineuses	41
III.4. Conclusions	41

Chapitre I	
Propriétés méthylo trophiques du partenaire bactérien et conséquences sur sa plante-hôte	44
I. Rôle de la méthylo trophie durant la symbiose entre <i>Methylobacterium nodulans</i> et <i>Crotalaria podocarpa</i>	44
I.1. Introduction	44
I.2. Article 1: "Role of methylo trophy during symbiosis between <i>Methylobacterium nodulans</i> and <i>Crotalaria podocarpa</i> ".	45
II. Compléments d'études	54
II.1. Expression de la méthylo trophie dans les nodules	54
II.2. Ontogenèse nodulaire	55
II.3. Histologie du nodule	55
II.3.1. Compartimentation observée dans les nodules de <i>Crotalaria podocarpa</i>	56
II.3.2. Zone d'expression de la méthylo trophie	57
II.3.3. Zone III ou zone potentiellement fixatrice d'azote	60
III. Discussion générale	62
III.1. Structure du nodule de <i>Crotalaria podocarpa</i> en symbiose avec <i>Methylobacterium nodulans</i>	62
III.2. Singularités et conséquences des propriétés méthylo trophiques du partenaire bactérien sur sa plante hôte	62
III.3. Energie allouée à la différenciation des bactéries en bactéroïdes	64
III.4. Stockage de l'énergie carbonée par la plante	65
III.5. Hypothèse de fonctionnement du nodule de <i>Crotalaria podocarpa</i>	69
Planches photographiques	
Chapitre II	
Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques	72
I. Introduction	72
II. Etude biochimique de l'exsudat racinaire de <i>Crotalaria podocarpa</i>	74
II.1. Production de l'exsudat racinaire	74
II.2. Capacité de l'exsudat racinaire à induire les gènes nod	74
II.3. Analyse chimique de l'exsudat racinaire par Chromatographie sur Couche Mince	75
II.3.1. Etude préliminaire	75
II.3.2. Etude de l'exsudat racinaire de <i>Crotalaria podocarpa</i>	76
II.4. Analyse chimique de l'exsudat racinaire par Chromatographie Liquide Haute Performance	77
II.4.1. Etude préliminaire	77
II.4.2. Etude de l'exsudat racinaire de <i>Crotalaria podocarpa</i>	78
II.5. Conclusions intermédiaires	79
III. Recherche des conditions optimales pour l'induction des gènes de nodulation de <i>M. nodulans</i>	80
III.1. Résultats	81
III.2. Conclusions intermédiaires	82

IV. Article 2 : « Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T : a classic process for an atypical symbiont » 83

IV.1. Abstract	83
IV.2. Introduction	84
IV.3. Materials and methods	86
IV.3.1. Bacterial strains and cultures	86
IV.3.2. Molecular techniques	86
IV.3.3. Construction of a ORS 2060 <i>nodA-LacZ</i> transcriptional fusion	87
IV.3.4. <i>Methylobacterium nodulans nodA</i> gene induction by flavonoids	87
IV.3.5. Nod factor extraction and purification	88
IV.3.6. Mass spectrometry	88
IV.3.7. Phylogenetic analyses	88
IV.4. Results	89
IV.4.1. Organization and analysis of nod genes in <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	89
IV.4.2. The expression of <i>nodA</i> is inducible by the flavone apigenin	92
IV.4.3. <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 produces pentameric LCOs 6-0 sulphated at the reducing end	
IV.5. Discussion	96

V. Discussion générale 100

Chapitre III Spécificité de symbiose 102

I. Introduction 102

II. Etude complémentaire des exsudats racinaires de *Crotalaria podocarpa* 105

II.1. Toxicité de l'exsudat racinaire de <i>C. podocarpa</i>	105
II.2. Influence de <i>M. nodulans</i> dans la rhizosphère de <i>C. podocarpa</i>	106
II.3. Conclusions intermédiaires	109

III. Importance des caractéristiques structurales des inducteurs 111

III.1. Effets sur l'induction des gènes nod	111
III.2. Effets sur la croissance bactérienne	112
III.3. Conclusions intermédiaires	114

IV. Spécificité de symbiose rhizobium - *Crotalaria* 116

IV.1. Spécificité de nodulation des <i>Crotalaria</i> étudiées	116
IV.2. Capacité de fixation d'azote des crotalaires étudiées	118
IV.3. Etude chimique préliminaire des exsudats racinaires des crotalaires étudiées par CLHP	120
IV.4. Conclusions intermédiaires	122

V. Discussion générale 122

V.1. Exsudats racinaires de <i>C. podocarpa</i>	122
V.2. Importance des caractéristiques structurales des inducteurs	125
V.3. Spécificité de symbiose	127

Conclusions générales et perspectives	129
I. Propriétés méthylophiles du partenaire bactérien et conséquences sur sa plante-hôte	129
II. Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques	131
III. Spécificité de symbiose	133
IV. Valorisation des résultats et applications potentielles	136
Matériel et Méthodes	137
I. Matériel	137
I.1. Matériel microbiologique	
I.1.1. Souches bactériennes	
I.1.2. Milieux de culture	
I.1.3. Pré-cultures bactériennes	
I.2. Matériel végétal	
I.2.1. Graines de <i>Crotalaria</i>	
I.2.2. Germination	
I.2.3. Production d'exsudats racinaires	
I.2.4. Tests de nodulation	
II. Méthodes	140
II.1. Histologie	
II.1.1. Détection de l'activité β -gal <i>in planta</i>	
II.1.2. Colorations	
II.2. Flavonoïdes	
II.3. Tests de croissance bactérienne en milieu complété	
II.4. Mesure de l'activité β -galactosidase	
II.5. Techniques chromatographiques	
II.6. Mesure de l'activité réductrice acétylène (ARA)	
Références Bibliographiques	145

Liste des figures

n°	Analyse Bibliographique	page
1	Phylogénie des Légumineuses	6
2	Les symbionts bactériens au sein des protéobactéries	9
3	Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel chez <i>Medicago</i>	10
4	Représentation schématique de la structure des nodules de Légumineuses	11
5	La symbiose rhizobium-Légumineuse : avec ou sans facteur Nod ?	12
6	Représentation schématique du dialogue moléculaire rhizobium-Légumineuse	13
7	Voie de biosynthèse des principales sous-classes de flavonoïdes	15
8	Présentation simplifiée d'un facteur Nod	17
9	Représentation schématique des différentes possibilités de substitutions greffées au facteur Nod	18
10	Modèle d'action de la protéine NodD	23
11	Reconnaissance et transduction du signal « facteur Nod » chez la plante modèle <i>Lotus japonicum</i>	26
12	Place du genre <i>Crotalaria</i> dans la phylogénie des Légumineuses	30
13	Oxydation du méthanol chez les bactéries méthylotrophes	35
14	Modules du métabolisme méthylotrophique chez <i>Methylobacterium extorquens</i>	37
15	Arbre phylogénétique non enraciné montrant les différentes branches des rhizobia, incluant la nouvelle espèce " <i>M. nodulans</i> " dans la subdivision des α -protéobactéries	40
16	Relations phylogénétiques d'isolats nodulant de <i>Lotononis bainesii</i> en comparaison avec d'autres rhizobia et d'autres α -protéobactéries	42
Chapitre I		
Propriétés méthylotrophiques du partenaire bactérien et conséquences sur sa plante-hôte		
17	Comparaison de la croissance bactérienne en milieu minimum complémenté avec différents substrats	59
18	Déméthylestérification des pectines par les pectines méthylestérases (PME)	63
19	Représentation schématique de la dégradation apicale intervenant chez les nodules de <i>C. podocarpa</i>	63
20	Représentation schématique du métabolisme du nodule	66
21	Représentation schématique du métabolisme dans les nodules induits par Sm1021 <i>exoY</i> ::Tn5 and Sm1021 <i>nifH</i> ::Tn5	68
22	Représentation schématique du métabolisme du nodule de <i>Crotalaria podocarpa</i>	69
23	Remplissage du nodule par les amyloplastes	71
Chapitre II		
Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques		
24	Induction <i>in vitro</i> du promoteur du gène <i>nodA</i> de <i>M. nodulans</i> ORS 2060 par l'exsudat racinaire de <i>C. podocarpa</i> et deux flavonoïdes standards	74
25	Analyse de l'exsudat racinaire de <i>Crotalaria podocarpa</i> par chromatographie sur couche mince	76
26	Chromatogramme de l'exsudat racinaire de <i>Crotalaria podocarpa</i>	78
27	Effets du délai d'addition de l'apigénine sur l'activité du gène <i>nodA</i> de <i>M. nodulans</i>	81

28	Effets de la concentration en inducteur sur l'activité du gène <i>nodA</i> de <i>M. nodulans</i>	82
SBB1	Comparison of nodulation genes operons in <i>Methylobacterium</i> sp. 4-46 and <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	89
SBB2	Maximum likelihood (ML) phylogenies of <i>nodABCIJ</i> concatenated alignments and <i>nodA</i> gene	91
SBB3	Flavonoid chemical structures	92
SBB4	HPLC profiles of <i>n</i> -butanol extract induced with apigenin or not induced from <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 culture	94
SBB5	Results of the mass spectrometric analysis of the C ₁₈ high performance liquid chromatography fractions and structure of <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 Nod factor	95

Chapitre III
Spécificité de symbiose

29	Effets des exsudats racinaires de <i>Crotalaria podocarpa</i> sur la croissance de <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 et de <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 1810	105
30	Chromatogramme CLHP des exsudats racinaires de <i>C. podocarpa</i> ($\lambda = 325$ nm)	107
31	Chromatogramme CLHP des exsudats racinaires de <i>C. podocarpa</i> ($200 \text{ nm} < \lambda < 400$ nm).	108
32	Spectres UV du composé PO6 et de la daidzéine	109
33	Tests d'un panel de flavonoïdes sur la capacité à induire les gènes <i>nod</i> et à stimuler la croissance bactérienne	112
34	Tests d'inoculations croisées sur dix espèces de crotalaires	117
35	Nodules de <i>Crotalaria retusa</i>	119
36	Chromatogrammes CLHP des exsudats racinaires de 6 espèces de <i>Crotalaria</i> ($200 \text{ nm} < \lambda < 400$ nm)	121
37	Illustration de l'hypothèse d'une co-élution entre l'apigénine 7-O-glucoside (λ_{max} 268 et 333nm) et un composé X (λ_{max} 312 nm).	123

Matériel et Méthodes

38	Dispositif de production des exsudats racinaires de <i>C. podocarpa</i>	139
----	---	-----

Liste des tableaux

n°	<i>Analyse Bibliographique</i>	page
I	Inducteurs isolés à partir de Légumineuses	24
II	Liste non exhaustive des flavonoïdes identifiés chez les crotalaires	33
III	Les différentes espèces de <i>Methylobacterium</i> identifiées à ce jour	34
Chapitre II		
Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques		
IV	Caractéristiques chromatographiques de différents flavonoïdes standards	77
V	Caractéristiques chromatographiques des cinq pics déterminés	78
SBBI	Induction of the <i>Methylobacterium nodulans nodA</i> promoter by flavonoids	93
Chapitre III		
Spécificité de symbiose		
VI	Capacité inductrice du gène <i>nodA</i> de <i>Methylobacterium nodulans</i> de différents flavonoïdes	112
VII	Tests d'inoculation croisées : relevé des biomasses obtenues	116
VIII	Tests d'inoculation croisées : caractérisation des nodules observés	118
IX	Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA)	119
X	Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA)	123

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION AU SUJET DE THESE

L'azote est un facteur limitant majeur des productions végétales, bien que l'atmosphère en constitue une réserve inépuisable. Ce paradoxe apparent est dû au fait que les plantes, comme tous les organismes eucaryotes, sont incapables d'utiliser l'azote moléculaire N_2 . Seuls certains procaryotes, appelés fixateurs d'azote, sont capables de réduire l'azote moléculaire en ammoniacque assimilable par les plantes. Il existe des fixateurs libres et des fixateurs symbiotiques. La réduction de l'azote étant coûteuse en énergie, les systèmes les plus efficaces sont ceux qui permettent un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse (Hopkins, 2003). C'est le cas des systèmes symbiotiques qui associent la majorité des plantes de la famille des Légumineuses à des bactéries appelées collectivement rhizobia.

La symbiose rhizobium-Légumineuse est un modèle d'interaction à bénéfice réciproque étudié depuis plus d'un siècle (Hopkins, 2003). Malgré l'avancée des recherches dans le domaine de la rhizobiologie, la complexité de la spécificité des interactions entre les partenaires symbiotiques ainsi que la vaste diversité taxonomique de ces derniers, ont pour conséquence une connaissance incomplète des propriétés symbiotiques des rhizobia. Or tout l'intérêt écologique et agronomique de cette symbiose est de connaître des couples de partenaires efficaces adaptés à des conditions écologiques et agronomiques précises. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de prédire rapidement le spectre d'hôtes d'une souche de rhizobium, sans passer par des études expérimentales de test de nodulation qui sont forcément biaisées par le choix des plantes testées (étant donné qu'il existe 18000 espèces de Légumineuses).

Nombreuses sont donc les étapes moléculaires influant sur la spécificité d'hôtes des rhizobia, l'étape cruciale étant l'échange et la reconnaissance de signaux émis réciproquement entre la plante et la bactérie. Les facteurs Nod, signaux bactériens vers la plante, sont les plus étudiés. Ces composés ont en effet un rôle biologique très important, car ils déclenchent l'organogenèse du nodule et sont indispensables pour l'infection et la colonisation de la plante hôte. Cette reconnaissance suppose la présence chez la plante de récepteurs spécifiques aux différentes structures de facteurs Nod produits par les rhizobia. Néanmoins, les facteurs Nod ne représentent qu'un des nombreux signaux émis par les rhizobia vers la plante hôte : une analyse fine de la littérature révèle que les flavonoïdes, signaux exsudés par la plante pour la bactérie, initient, régulent et arbitrent la production de la plupart d'entre eux. Depuis l'identification de la lutéoline et de la 7,4'-dihydroxyflavone comme inducteurs de l'expression des gènes de nodulation des rhizobia en 1986 (Cooper, 2004), il est accepté que

les flavonoïdes soient (i) des acteurs clés dans le dialogue moléculaire entre les plantes et les bactéries et (ii) une condition *sine qua non* pour l'infection dans toute la littérature sur les Légumineuses décrite à ce jour (Cooper, 2004).

CONTEXTE DE L'ETUDE

En Afrique subsaharienne, l'agriculture traditionnelle a longtemps été caractérisée par l'alternance d'une mise en culture des sols, suivie d'un abandon cultural après baisse des rendements. Cette seconde phase permettait la remontée de la fertilité des sols grâce à une jachère de longue durée qui favorisait un retour vers une savane arbustive ou arborée (Serpantié et Floret, 1994). Mais la pression démographique et le besoin important de terres cultivables ont considérablement raccourci le temps de jachère. Celle-ci, lorsqu'elle n'a pas totalement disparu, ne joue plus que partiellement son rôle de reconstitution de la fertilité des sols ce qui conduit à l'épuisement prématuré des sols. Une des solutions durables pour inverser cette tendance passe par une amélioration de l'efficacité de cette jachère courte dans le maintien de la fertilité des sols, notamment en favorisant un enrichissement des jachères en Légumineuses.

Les Légumineuses tropicales spontanées de jachères, annuelles ou pérennes ont longtemps été considérées comme des « mauvaises herbes ». Pourtant, grâce à leur symbiose avec les rhizobia, elles jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols. Lors d'un premier travail de prospection botanique sur l'ensemble du Sénégal, des chercheurs avaient constitué une collection de graines de petites Légumineuses de jachères et étudié leurs propriétés germinatives en milieu aride (Sy, 1995 ; Sy *et al.*, 1997). Parallèlement, l'isolement des premières souches de rhizobia à partir des nodules récoltés sur le terrain (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999, 2000) avait confirmé que les petites Légumineuses de jachères étaient nodulées par des souches bactériennes appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Ce genre bactérien, classiquement associé à la grande majorité des Légumineuses tropicales, est caractérisé par un large spectre d'hôtes qui lui permet de fixer efficacement l'azote dans les nodules de nombreuses espèces de Légumineuses tropicales.

Après cette étude de la diversité des rhizobia des Légumineuses de jachère, les auteurs se sont particulièrement intéressés au genre *Crotalaria* dont plus de trente espèces sont communément rencontrées dans les jachères du Sénégal. Après avoir constitué une collection de rhizobia à croissance lente, les auteurs ont d'abord montré la grande diversité de ces souches puisqu'elles forment différents groupes phylogénétiques au sein du genre *Bradyrhizobium* (Samba *et al.*, 1999 ; Sy, 2001).

Néanmoins plusieurs espèces de *Crotalaria* (*C. glaucoides*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa*) présentaient une spécificité de nodulation, ne formant des nodules qu'avec des souches à croissance rapide. Leurs caractérisations génotypique et phylogénétique ont montré qu'elles appartenaient au genre *Methylobacterium*. Ainsi, une nouvelle espèce, nommée *Methylobacterium nodulans*, a été isolée de *C. podocarpa* (Sy et al., 2001a et b ; Jourand et al., 2004a).

Outre leur potentiel fixateur d'azote, les crotalaires présentent un second avantage agronomique : elles sont en effet connues pour être d'excellentes plantes-pièges pour les nématodes, limitant fortement les populations de ces importants ravageurs des cultures.

Différents auteurs se sont donc intéressés à l'activité biologique des trois espèces de crotalaires entrant en symbiose avec *M. nodulans*, mais également à celle de douze autres espèces vis-à-vis de nématodes phytoparasites majeurs des plantes cultivées (Jourand, 2003). Elles sont toutes, à des degrés variables, résistantes aux principaux phytoparasites du genre *Meloidogyne* (Jourand et al., 2004b et c). Les extraits aqueux de feuilles et de racines de la majorité d'entre-elles paralysent réversiblement les nématodes juvéniles au stade infestant, suggérant un fort potentiel nématostatique de leur engrais vert (Jourand, 2003). Les essais agronomiques en conditions méditerranéennes ou tropicales montrent que la culture de la plupart de ces crotalaires, comme leur engrais vert permettent de réduire fortement la population dominante de nématodes protégeant ainsi efficacement les cultures maraîchères sensibles.

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Du fait du potentiel agronomique de la symbiose originale *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa*, basé sur ses propriétés engrais vert et ses propriétés biologiques contre les nématodes du sol, les objectifs principaux de ce travail de thèse ont donc consisté (i) à aborder la compréhension de la mise en place de cette association singulière et (ii) à établir des hypothèses quant à la caractérisation chimique du dialogue moléculaire intervenant dans cette interaction mutualiste.

La synthèse bibliographique s'articule en trois volets. En premier lieu, un état des connaissances générales sur la symbiose rhizobium-Légumineuses est succinctement rappelé. Un accent particulier est ensuite porté sur le dialogue moléculaire nécessaire à la mise en place de la symbiose, et plus particulièrement, sur les connaissances des deux acteurs principaux, les flavonoïdes et les facteurs Nod, d'un point de vue de leur structure chimique

puis de leurs interactions. Enfin, un troisième volet retrace la découverte de notre modèle d'étude, à savoir la symbiose entre la légumineuse tropicale *Crotalaria podocarpa* et un organisme méthylotrophe, *Methylobacterium nodulans*.

Dans le chapitre I, intitulé « Propriétés méthylotrophiques du partenaire bactérien et conséquences pour sa plante hôte », j'ai repris les travaux portant sur l'étude du rôle de la méthylotrophie dans la symbiose fixatrice d'azote auxquels j'ai contribué et qui ont fait l'objet d'une première publication (Jourand et *al.*, 2005). Les travaux sur l'expression de la méthylotrophie *in planta* ont été poursuivis et les données complétées en réalisant une étude cytologique et ultrastructurale du nodule de *C. podocarpa*. Des caractéristiques propres à ce nodule ont été observées et nous avons pu émettre des hypothèses quant au fonctionnement non conventionnel de ce dernier.

Le chapitre II, intitulé « Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques », est consacré à l'élucidation des signaux réciproques se mettant en place entre la bactérie et sa plante hôte. Nous nous sommes intéressés au contenu de l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* et à ses propriétés inductrices des gènes nod de *M. nodulans*. Par ailleurs, les travaux portant sur l'identification et l'induction des gènes de nodulation de *M. nodulans*, ainsi que la caractérisation d'une structure de facteur Nod, ont fait l'objet d'une seconde publication (Renier et *al.*, 2008).

Enfin, la compréhension de la spécificité de symbiose entre les espèces de crotalaires et *M. nodulans*, a été abordée dans le chapitre III intitulé « Spécificité de symbiose ». En reprenant les tests d'inoculations croisées initiés par Sy et *al.* (2001b), nous avons recherché des groupes de spécificité des crotalaires vis-à-vis de *M. nodulans* et émis des hypothèses quant aux bases de cette spécificité. Nous avons ensuite réalisé une étude préliminaire des exsudats racinaires de différentes espèces de crotalaires, entrant ou non en symbiose avec *M. nodulans*, à la recherche de la ou des « molécule(s) de spécificité ».

Une conclusion générale reprend les principaux résultats et présente des perspectives de travaux complémentaires afin d'argumenter et de valoriser les hypothèses énoncées.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La symbiose rhizobium-Légumineuse

L'azote est l'un des éléments majeurs de la matière vivante. Dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles, ce qui constitue souvent un des principaux facteurs limitants de la croissance des végétaux. L'azote est cependant très abondant dans l'atmosphère qui contient 78% de diazote (N_2), mais les seuls organismes capables de l'utiliser sont les bactéries diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique nitrogénase. Pour certains groupes de végétaux, l'association avec ce type de bactéries leur permet d'améliorer leur nutrition azotée. Quand l'association est très étroite, on parle de symbiose (Marschner, 1995).

Deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes : les Légumineuses qui s'associent aux rhizobia, développés ci-après, et les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries du genre *Frankia*. Dans les deux cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation d'un nouvel organe au niveau des racines (et/ou tiges), le nodule fixateur d'azote. Dans les nodules, les bactéries, protégées et nourries par la plante, lui fournissent en échange de l'azote fixé.

I.1. Les Légumineuses

Les *Fabaceae* (anciennement nommées Légumineuses) représentent une large famille chez les Angiospermes, comprenant plus de 650 genres et 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae* en termes de diversité. Les *Fabaceae* sont divisées en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinoideae* et les *Papilionoideae* (Fig. 1).

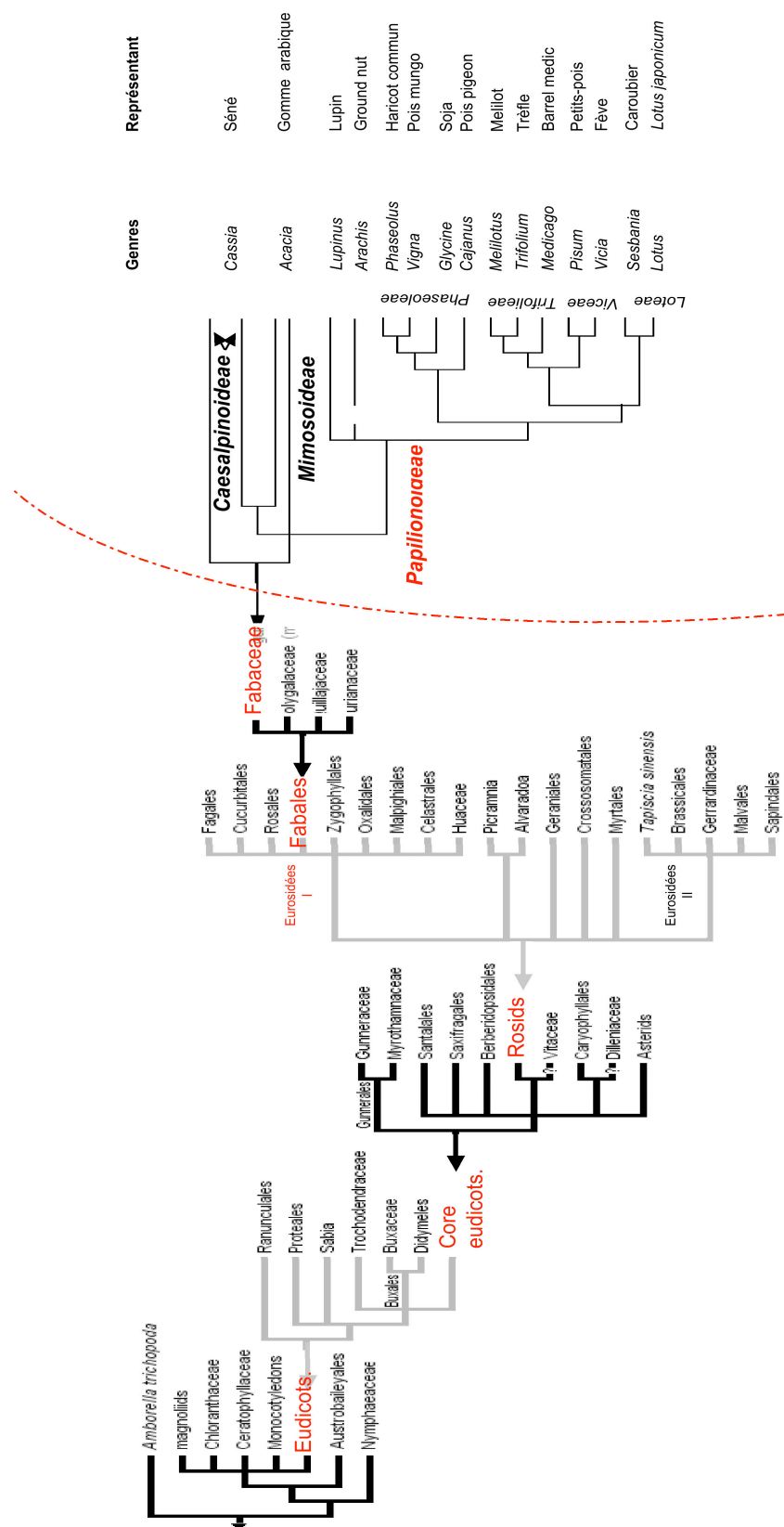


Figure 1. Phylogénie des Légumineuses.

Les Légumineuses sont regroupées en trois grandes sous-familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae*, comprenant de nombreuses espèces cultivées.

D'après <http://www.tolweb.org/angiosperms> et Young *et al.* (2003).

La sous-famille des *Caesalpinoideae*, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Seules 23% des espèces (parmi celles qui ont été étudiées) sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des *Caesalpinieae* et des *Cassieae* ; les tribus *Cercideae*, *Detaieae* et *Amherstieae* sont très peu nodulées (Faria et al., 1989).

La sous-famille des *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres et environ 2500 espèces, dont la majorité (90%) sont nodulées (parmi les 10% testées, Faria et al., 1989).

Enfin, les *Papilionoideae* représentent la sous-famille la plus diverse avec environ 430 genres et plus de 12000 espèces, dont 97% parmi les espèces testées (21% du total) sont nodulées par les rhizobia (Faria et al., 1989). Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes, mais comprennent aussi des arbres et des arbustes, présents en régions tempérées et tropicales.

Ainsi, la majeure partie des Légumineuses (88% des espèces étudiées ; Faria et al., 1989) interagit avec des rhizobia pour former des nodules fixateurs d'azote (Hirsch et al., 2001) et comprend donc des candidats potentiels pour l'agriculture en tant qu'engrais vert azoté ou pour l'enrichissement des sols. De plus, de nombreuses Légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales (Graham & Vance, 2003) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*), ou encore la cacahuète (*Arachis hypogea*).

Du fait de leur potentiel agronomique et de leur propriété singulière à entrer en symbiose avec des microorganismes du sol, les Légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Gage, 2004 ; Patriarca et al., 2004 ; Stacey et al., 2006). Notamment, l'émergence de deux plantes modèles à savoir le lotier (*Lotus japonicus*) (Handberg & Stougaard, 1992 ; Udvardi et al., 2005) et la luzerne (*Medicago truncatula*) (Barker et al., 1990) a permis d'accélérer l'étude des mécanismes de mise en place de leur symbiose.

I.2. Les bactéries fixatrices d'azote

La fixation biologique de l'azote est l'une des fonctions accessoires les plus répandues dans le monde vivant. Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires : les archaeobactéries et les eubactéries (Young, 1992). Si l'on considère l'arbre phylogénétique des eubactéries (basé sur leur ADNr 16S), on constate que les fixateurs d'azote sont présents dans tous les grands groupes bactériens. Ceci laisse supposer que la propriété de fixer l'azote est très ancienne et qu'elle a joué un rôle prépondérant dans l'établissement et le maintien de la vie sur terre. Chez les eubactéries, la fixation d'azote est associée à une large diversité de métabolismes, des bactéries anaérobies aux aérobies, aux bactéries photosynthétiques, jusqu'aux cyanobactéries et actinomycètes. Certains fixateurs d'azote sont associés à des plantes (symbioses vraies ou associatives) ou demeurent à l'état libre dans le sol et les eaux. Les fixateurs libres comprennent des genres variés : bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Acetobacter*, *Azobacter*, *Azospirillum*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*).

Le groupe des rhizobia comprend des bactéries très diverses qui ont en commun leur aptitude à induire la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines ou les tiges des Légumineuses. Quatre genres d' α -protéobactéries (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*) constituent les symbionts prédominants de la plupart des espèces de Légumineuses rencontrées à travers le monde (Fig. 2). Néanmoins, des lignées supplémentaires d' α -protéobactéries, formant des nodules et ayant une distribution géographique réduite et un spectre d'hôtes limité, ont été découvertes depuis quelques années : *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988 ; Moreira et al., 2006), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001a et b ; Jaftha et al., 2002), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005 ; Zurdo-Pineirro et al., 2007), *Devosia* (Rivas et al., 2002). Par ailleurs, des symbionts de Légumineuses ont également été trouvés dans au moins deux lignées de β protéobactéries (Fig. 2), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001 ; Chen et al., 2003, 2005) et *Cupriavidus* (Chen et al., 2003 ; Barrett & Parker, 2006).

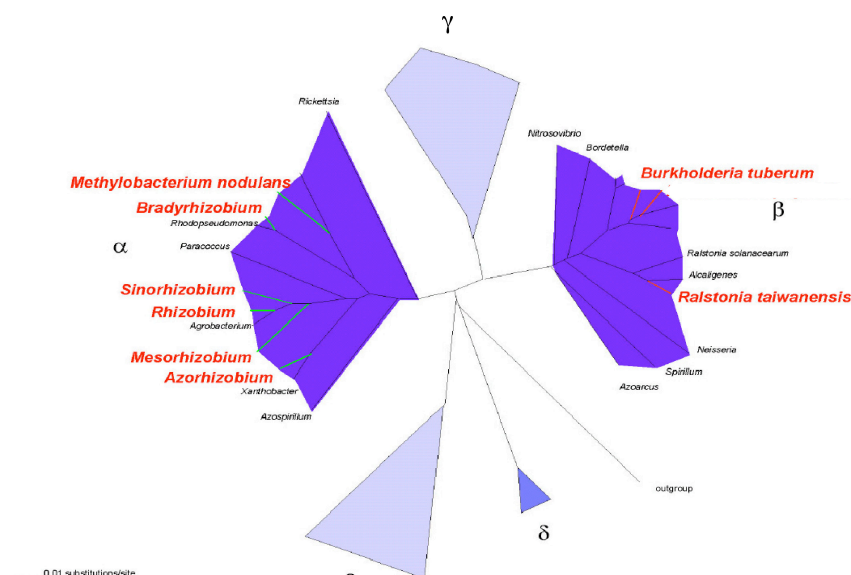


Figure 2. Les symbionts bactériens au sein des protéobactéries.

(http://www2.toulouse.inra.fr/centre/lipm/fr/interactions_symbiotiques/cm_equipe.php)

I.3. La formation du nodule

La formation du nodule peut se résumer en trois étapes clés : la pré-infection, qui correspond au dialogue moléculaire se mettant en place entre les deux partenaires symbiotiques, l'infection, correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la Légumineuse, et le développement proprement dit du nodule.

I.3.1. La pré-infection

cf « II. Aspects symbiotiques : le dialogue moléculaire »

I.3.2. L'infection

Il existe une variabilité dans le type d'infection et dans la morphologie des nodules chez les Légumineuses. Les rhizobia sont capables de pénétrer à l'intérieur des Légumineuses via deux modes d'infection distincts (Sprent & Raven, 1992 ; Sprent, 1993).

- Par voie intracellulaire : dans ce cas, l'infection se produit par l'intermédiaire d'un cordon d'infection qui achemine les bactéries du chevelu racinaire vers le cortex et les distribue aux cellules, qui deviennent les cellules infectées du nodule fixateur d'azote (Fig. 3). Ce mode est par exemple observé chez le pois, la luzerne ou encore le soja.

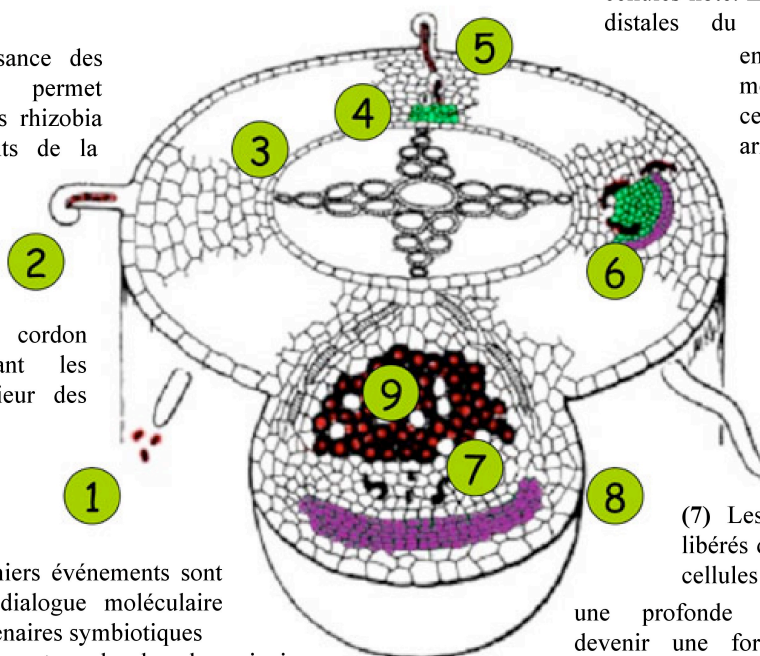
(4) Des divisions successives mènent à la formation d'un primordium nodulaire.

(5) Les cordons d'infection avancent vers le primordium.

(3) En même temps, des cellules corticales en face du site d'infection sont activées, se différencient et se divisent.

(6) Quand ils atteignent les cellules du primordium, les rhizobia sont libérés dans le cytoplasme des cellules hôte. Les cellules les plus distales du primordium, non envahies, forment un méristème tandis que les cellules infectées arrêtent de se diviser et débutent un processus de différenciation en cellules fixatrices d'azote.

(2) La reconnaissance des facteurs Nod permet "l'attachement" des rhizobia aux poils absorbants de la racine marquant ainsi le début de l'infection par la formation de structures tubulaires ou cordon d'infection guidant les rhizobia à l'intérieur des tissus de la plante.



(1) Les deux premiers événements sont amorcés par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques dans la rhizosphère autour du chevelu racinaire. Les flavonoides exsudés par la racine sont détectés par les rhizobia et mènent à la synthèse d'un signal réciproque bactérien nommé le facteur Nod.

(7) Les rhizobia récemment libérés dans le cytoplasme des cellules végétales subissent une profonde transformation pour devenir une forme mature fixatrice d'azote, le bactéroïde.

(8) L'activité du méristème est persistante et le processus d'infection continu. Par conséquent, le nodule formé est composé de différentes zones différentes : la zone I correspondant au méristème, la zone II correspondant à la zone de différenciation et l'infection, La zone III composée de cellules hôtes remplies de bactéroïdes fixateurs d'azote (9) et une zone IV ou zone de sénescence.

Figure 3. Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel chez *Medicago*.

(http://www.isv.cnrs-gif.fr/ak/theme_symbios.html)

Le second mode d'infection est l'infection par voie intercellulaire ou « crack-entry ». Dans ce cas, l'infection se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, par des blessures occasionnées par des éléments extérieurs ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawlowski & Bisseling, 1996). Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection.

I.3.3. Le développement du nodule

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher & Kondorosi, 2000). Les nodules de type indéterminé (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique (Fig. 4B). Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée (Fig. 4A).

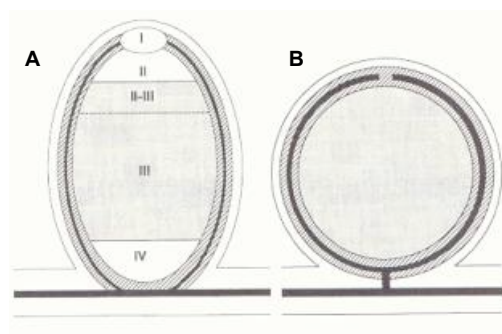


Figure 4. Représentation schématique de la structure des nodules de Légumineuses.

Nodule de type indéterminé présentant une zone méristématique (I), une zone de préfixation (II), une zone de fixation (III) et une zone de sénescence (IV) (A). Nodule de type déterminé (B).

D'après Pawlowski et Bisseling (1996).

I.4. Nouvelles avancées sur la symbiose rhizobium-Légumineuse

Il est communément accepté que les facteurs de nodulation sécrétés par les rhizobia sont capables d'initier la formation de nodules sur les plantes hôtes. Or, très récemment, Giraud et *al.* (2007) ont révisé ce dogme. Ils ont déterminé que les génomes de deux souches de bactéries fixatrices d'azote (*Bradyrhizobium* sp. ORS 278 et BTAi1) entrant en symbiose avec des Légumineuses du genre *Aeschynomene* ne contenaient ni le gène *nodA* ni le gène *nodC*, qui sont essentiels pour la synthèse des facteurs Nod. Ceci signifie que ces bactéries possèdent une voie alternative pour initier le dialogue conduisant à la formation de la nodulation chez les Légumineuses (Fig. 5).

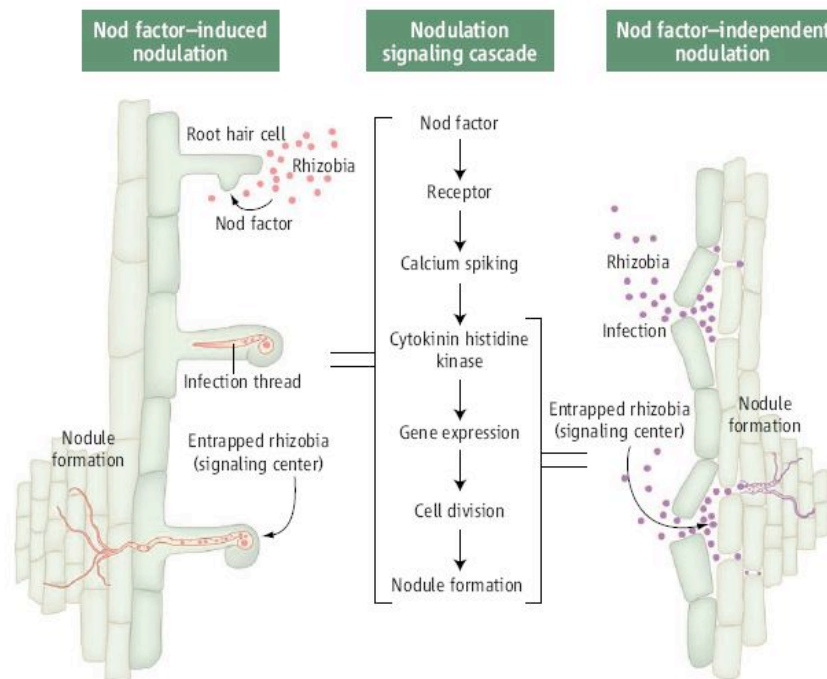


Figure 5. La symbiose rhizobium-Légumineuse : avec ou sans facteur Nod ?

Les facteurs Nod sont produits par la bactérie symbiotique infectant la légumineuse hôte et initie la formation de nodules fixateurs d'azote (gauche). La nodulation facteur Nod-indépendante résulte d'une colonisation bactérienne par une rupture de l'épiderme de la racine (droite). L'augmentation de la sensibilité pour le signal cytokininine-like peut permettre à la cascade de signalisation du facteur Nod d'être contournée menant à la nodulation et à l'infection sans facteur Nod.

Issue de Downie (2007).

II. Aspects symbiotiques : le dialogue moléculaire

La progression vers un stade symbiotique entre deux partenaires initialement indépendants, est gouvernée par la génération et la perception de signaux réciproques qui ont été décrites comme « dialogue moléculaire » (Dénarié et al., 1993).

La symbiose rhizobium-Légumineuse est le résultat d'interactions complexes entre la bactérie et son hôte. Ces interactions débutent par une reconnaissance mutuelle faisant intervenir un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Long, 1996). Le dialogue moléculaire débute par l'exsudation, via les racines des Légumineuses, de composés phénoliques pouvant être des flavonoïdes (les plus étudiés), des stachydrines, ou des acides aldoniques (Fig. 6).

Ces composés sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, majoritairement les protéines NodD. Cette reconnaissance représente un premier niveau de spécificité de la symbiose. L'activation des protéines régulatrices bactériennes conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* communément rassemblés sous le terme gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (*nod*-box) situées en amont des gènes *nod*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitooligosaccharides appelés facteurs Nod, qui sont directement responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, de l'induction d'un méristème, de la formation des nodules chez la plante (Fig. 6). La reconnaissance du facteur Nod par la plante représente un second niveau de spécificité de la symbiose.

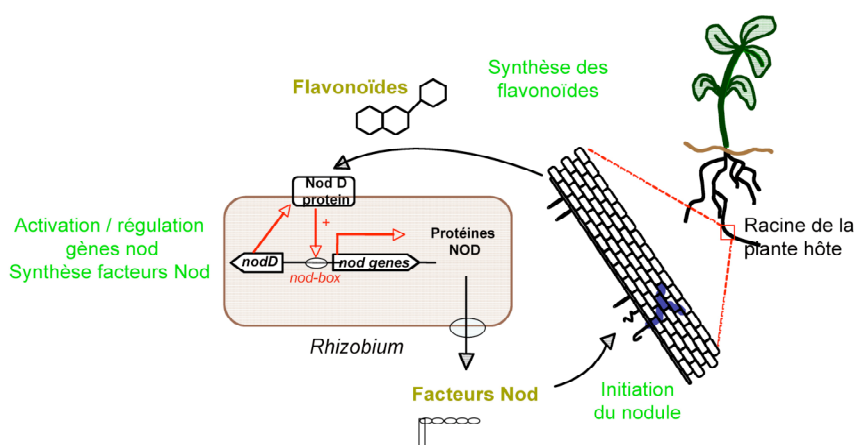


Figure 6. Représentation schématique du dialogue moléculaire rhizobium-Légumineuse.

II.1. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes de nodulation

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques, avec un squelette en C₁₅, diversifiés en forme et en fonction avec l'évolution des plantes. Les principales sous-classes, déterminées selon les caractéristiques structurales des composés, sont : les chalcones, les flavones et flavanones, les isoflavones et isoflavanes et des formes polymérisées telles que les proanthocyanidines (Fig. 7).

Les flavonoïdes sont impliqués dans de multiples fonctions chez les plantes, dont la pigmentation, la protection contre les ultraviolets et contre les formes réactives de l'oxygène, la fertilité du pollen, la régulation du transport d'auxine (Shirley, 1996 ; Woo et *al.*, 2002). Ils interviennent également dans les interactions avec les microorganismes symbiotiques comme molécules « signal » (Taylor & Grotewold, 2005) ou dans les interactions de défense contre les pathogènes.

Les flavonoïdes sont des produits de la voie centrale des phénylpropanoïdes du métabolisme secondaire des plantes. Ainsi, tous les flavonoïdes sont des dérivés de la phénylalanine à partir de la voie du shikimate et du malonyl-CoA issus de la réaction acétyl-CoA carboxylase. La condensation de 4 molécules de coumaryl-CoA, de la voie des phénylpropanoïdes, avec 3 molécules de malonyl-CoA par la chalcone synthase, crée la chalcone, précurseur central à partir duquel dérivent toutes les autres structures de flavonoïdes (Fig. 7) (Winkel-Shirley, 2001 ; Dixon et *al.*, 2002 ; Lepiniec et *al.*, 2006).

Bien que ces composés soient ubiquistes chez les végétaux supérieurs, des structures sont spécifiques à certaines familles de plantes. De plus, chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes dont la nature et la quantité varient en fonction de l'âge de la plante et de son état physiologique. Si plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes vasculaires, seules quelques formes particulières de flavonoïdes sont impliquées dans la spécificité d'hôtes chez les Légumineuses (Aoki et *al.*, 2000). Par exemple, la sous-classe des isoflavonoïdes est restreinte à la sous-famille des *Papilionoideae* (Dixon et *al.*, 2002).

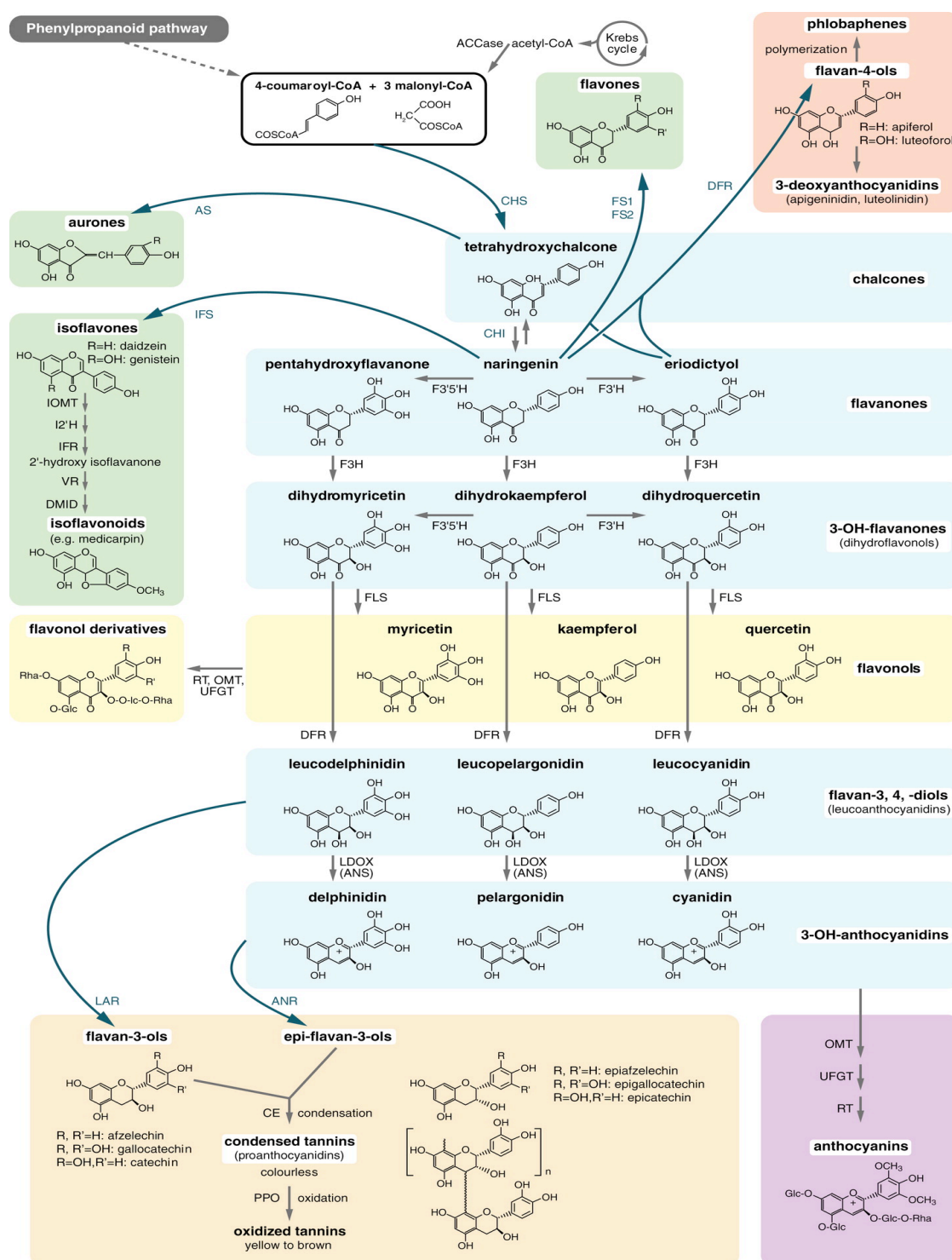


Figure 7. Voie de biosynthèse des principales sous-classes de flavonoïdes.

Abréviations : ACCase, acétyl-CoA carboxylase ; ANS, anthocyanidine synthase ; AS, aureusidine synthase ; DFR, 4-dihydroflavonol réductase ; DMID, 7,2-dihydroxy-4-méthoxyisoflavanol déshydratase ; F3H, flavanone 3-hydroxylase ; F3 H, flavonoid 3-hydroxylase ; F3 5 H, flavonoid 3 5 hydroxylase ; FLS, flavonol synthase ; FSI/FS2, flavone synthase ; I2 H, isoflavone 2 -hydroxylase ; IFR, isoflavone réductase ; IFS, isoflavone synthase ; IOMT, isoflavone O-méthyltransférase ; LAR, leucoanthocyanidin réductase ; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygénase ; OMT, O-méthyltransférase ; RT, rhamnosyl transférase ; UFGT, UDP flavonoid glucosyl transférase ; VR, vestitone réductase. D'après Lepiniec *et al.* (2006).

Dans la symbiose rhizobium-Légumineuse, les flavonoïdes des plantes hôtes ont été trouvés dans les téguments des graines et dans les exsudats racinaires. Les flavonoïdes contenus dans les téguments de graines sont simplement relargués dans l'eau environnante durant l'imbibition sans intervention de régulation métabolique (Hartwig & Phillips, 1991). Le stockage des flavonoïdes dans les racines et leur relargage par les tissus épidermiques sont en revanche sujets à un contrôle métabolique interne, et de fortes présomptions existent quant à un processus commun et/ou concomitant de synthèse et relargage (Jain & Nainawatee, 2002 ; Cooper, 2004).

Les flavonoïdes peuvent être exsudés par les plantes sous forme aglycone ou sous forme glycosylée (Maxwell et *al.*, 1989). Cette dernière est par nature plus soluble dans l'eau et peut, par conséquent, avoir un meilleur potentiel pour la diffusion à partir de la surface de la racine avant d'être hydrolysée sous forme aglycone par les rhizobia, par d'autres organismes du sol ou par des exoenzymes de plantes (Hartwig & Phillips, 1991). Les rhizobia eux-mêmes sont capables de modifier l'hydrophobicité des flavonoïdes aglycones. Par exemple, la complexation de la lutéoline par des cyclophoraoles produits par *Sinorhizobium meliloti* améliore nettement la solubilité de ces inducteurs des gènes nod (Lee et *al.*, 2003).

II.2. Les gènes de nodulation et les facteurs Nod

L'induction des protéines régulatrices par les flavonoïdes entraîne l'expression des gènes de nodulation communément appelés gènes nod. Les produits de ces gènes sont diverses enzymes impliquées dans la biosynthèse des facteurs Nod.

Tous les facteurs Nod décrits sont des lipochitooligosaccharides constitués de 3 à 5 résidus de N-acétyl-*D*-glucosamine (Fig. 8), substituée par une chaîne d'acyl au niveau de la glucosamine terminale non réductrice (Roche et *al.*, 1991b). Selon la nature du rhizobium, le squelette de base est substitué par des groupements chimiques variés (fucose, arabinose, carbamoyl, méthyl, ...), présents sur les glucosamines situées aux deux extrémités (Long, 1996 ; Perret et *al.*, 2000 ; D'Haeze & Holster, 2002).

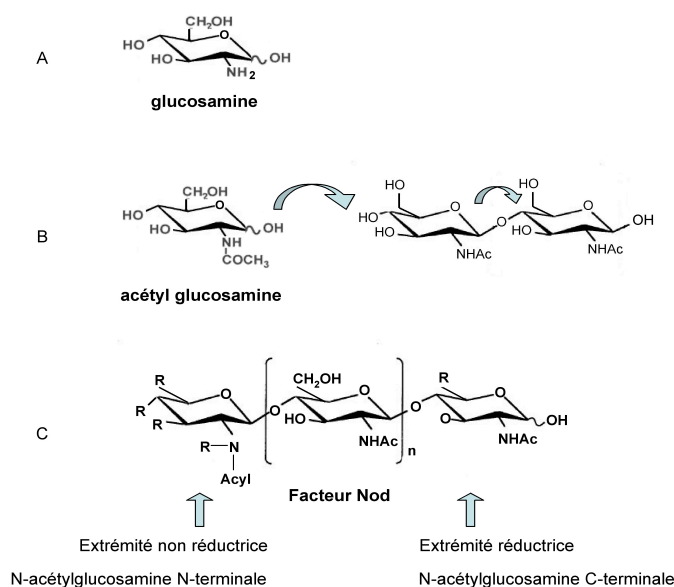


Figure 8. Présentation simplifiée d'un facteur Nod.

L'analyse des facteurs Nod de divers mutants a permis la caractérisation du rôle des gènes *nod* ainsi que leur classification en deux familles :

- les gènes *nod* communs présents dans le génome de tous les rhizobia et impliqués dans la synthèse du squelette de base des facteurs Nod,
- et les gènes *nod* spécifiques codant les enzymes impliquées dans le greffage de diverses substitutions chimiques sur le squelette de base, dont la nature et la présence varie d'une souche à l'autre (Downie, 1998).

II.2.1. Les gènes *nod* communs

Les gènes *nod* communs (*nodA*, *nodB*, *nodC*) sont présents en copie unique et sont responsables de la biosynthèse d'un facteur Nod "minimal" commun à toutes les souches de rhizobia. Une mutation dans l'un de ces gènes conduit au phénotype *nod*- (absence de nodulation) (Hirsch, 1992). La première étape de biosynthèse est sous le contrôle du gène *nodC* codant une N-acétyl-glucosamine transférase (Geremia et al., 1994). L'élongation de la chaîne de glucosamines par la protéine NodC se déroule à l'extrémité non réductrice (Kamst et al., 1999). La protéine NodB, codée par le gène *nodB*, est une déacétylase qui ôte le résidu N-acétyl à l'extrémité non réductrice du facteurs Nod (Spaink et al., 1994). Enfin, le gène *nodA* code une N-acyltransférase (Rohrig et al., 1994) spécifiant le transfert d'une chaîne d'acyl soit de type commun (acide gras mono- ou poly-insaturé provenant du métabolisme

général des lipides), soit de type $\alpha\beta$ -mono/poly insaturé (sous le contrôle des gènes *nodE* et *nodF*). Même s'ils sont dits "communs", les gènes *nodA* et *nodC* sont néanmoins impliqués dans la spécificité d'hôte (Roche et al., 1996).

II.2.2. Les gènes nod spécifiques

Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont donc nécessaires et suffisants pour la synthèse de dimères à pentamères acétylés de N-acétyl-D-glucosamine possédant une activité symbiotique sur certaines plantes (Banfalvi & Kondorosi, 1989 ; Spink et al., 1991 ; Plazinski et al., 1994). Toutes les autres substitutions sur les facteurs Nod (Fig. 9) doivent donc jouer un rôle plus complexe dans la nodulation, en permettant l'interaction avec certaines plantes ou en protégeant les facteurs Nod de la dégradation (Perret et al., 2000).

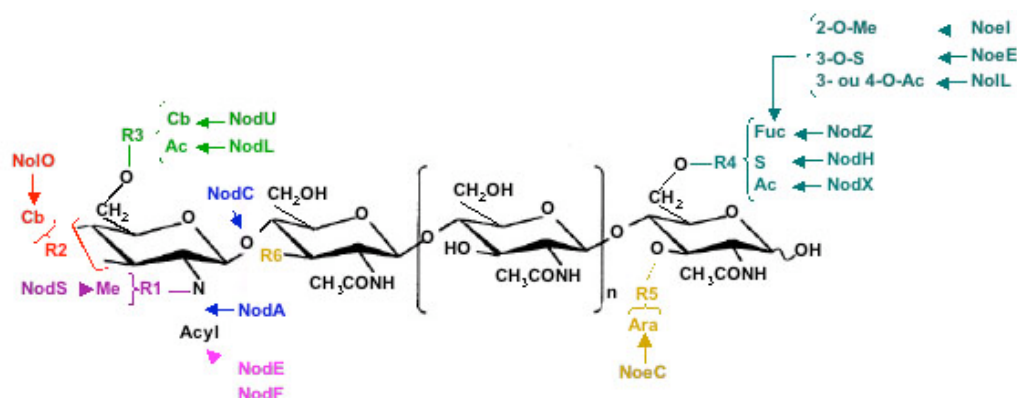


Figure 9. Représentation schématique des différentes possibilités de substitutions greffées au facteur Nod.

- Gène impliqué dans la synthèse du squelette oligosaccharidique ; *nodC* : Synthèse de chitine (Kamst et al., 2000).
- Gènes impliqués dans l'acylation des facteurs Nod ; *nodA* : Transférase d'une chaîne d'acyl (Ritsema et al., 1996), *nodE* : synthèse de β -acétoacétyl (Van der Drift, 1996), *nodF* : porteur d'acyl (Ritsema et al., 1994).
- Gènes impliqués dans l'O-glycosylations des facteurs Nod ; *nodZ* : α -1,6-transférase du fucose (Quesada-Vincens et al., 1997), *nolL* : 4-O-acétyltransférase du fucose (Berck et al., 1999), *noeC* : arabinosylation, *noeE* : sulfotransférase du fucose (Quesada-Vincens et al., 1998), *noeI* : 2-O-méthyltransférase du fucose (Jabbouri et al., 1998).
- Gènes impliqués dans d'autres substitutions ; *nodH* : sulfotransférase (Manyani et al., 2001), *nodL* : O-acétyltransférase (Lopez-Lara et al., 2001), *nodS* : N-méthyltransférase (Lopez-Lara et al., 2001), *nodU* : 6-O-carbamoyltransférase (Treilhou et al., 2000), *nodX* : O-acétyltransférase (Ovtsyna et al., 1999), *nolO* : 3-O-carbamoylation (Treilhou et al., 2000).

Ces substitutions peuvent être regroupées en différentes catégories.

*Les substitutions relatives à la chaîne d'acyl (sous contrôle des gènes *nodE* et *nodF*) :*

Deux types de chaîne d'acyl peuvent être liés à l'extrémité non réductrice du squelette oligosaccharidique par la protéine NodA : i) les acides gras relativement communs saturé ou mono-insaturé (respectivement l'acide stéarique et l'acide vaccénique) et plus rarement, ii) des composés hautement insaturés contenant 2 à 4 doubles liaisons comme ceux retrouvés chez les souches de *Rhizobium leguminosarum* et *R. meliloti* qui contiennent toutes deux les gènes *nodE* et *nodF* (Spaink et al., 1991 ; Dénarié et al., 1992).

Les substitutions correspondant à une 6-O-glycosylation :

* Arabinosylation (sous contrôle du gène *noeC*) : un arabinose en position C-3 de la glucosamine terminale côté réducteur (couplé ou non avec un fucose en C-6) est retrouvé chez les facteurs Nod des symbiontes de *Sesbania rostrata* (*Azorhizobium caulinodans*, *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga*) (Mergaert et al., 1996, 1997a et c). Le gène *noeC* est impliqué dans l'arabinosylation des facteurs Nod, mais sa fonction exacte n'est pas connue.

* Fucosylation (sous contrôle des gènes *nodZ* et *nolK*) : la fucosylation à l'extrémité réductrice est une substitution fréquemment retrouvée parmi les facteurs Nod chez de nombreux rhizobia (Stacey et al., 1994 ; Lopez-Lara et al., 1995, 1996 ; Mergaert et al., 1997b et c; Quesada-Vincens et al., 1997). Ce fucose jouerait un rôle à la fois dans la perception du signal facteur Nod par la plante et dans leur résistance aux chitinases végétales (Ovtsyna et al., 2000). Le transfert du fucose en position C-6 de la glucosamine terminale est sous le contrôle de la protéine NodZ (6-O-fucosyltransférase). Des substitutions sont souvent retrouvées sur le fucose, tel qu'un groupement 2-O-méthyl, 3-O ou 4-O-acétyl ou O-sulfate, la présence d'un acétyl excluant celle du sulfate et inversement. Un ensemble de gènes est impliqué dans la synthèse de GDP-L-fucose (*noeJ*, *noeK*, *noeL*, *nolK*) dont un modèle de biosynthèse a été proposé par Downie (1998).

*Les substitutions correspondant à une sulfatation (sous contrôle des gènes *nodH* et *noeE*) :*

Deux sulfotransférases distinctes, codées par les gènes *nodH* et *noeE*, sont responsables de la sulfatation des facteurs Nod à l'extrémité réductrice. La protéine NodH est responsable de la 6-O-sulfatation de la glucosamine terminale côté réducteur, mais peut aussi sulfater le résidu 2-O-méthylfucose (Lerouge et al., 1990 ; Roche et al., 1991a ; Hanin et al., 1997), alors que

la protéine NoeE est spécifique de la sulfatation du résidu 2-*O*-méthylfucose additionnel (Hanin et *al.*, 1997 ; Quesada-Vincens et *al.*, 1998).

Les substitutions correspondant à une acétylation (sous contrôle des gènes nodL, nodX et nolL) :

Contrairement aux groupements sulfate, des groupements acétyls se retrouvent sur les glucosamines des deux extrémités des facteurs Nod, soit sur le carbone en C-6 à chaque extrémité, soit sur le fucose additionnel. La protéine NodL est une *O*-acétyltransférase qui acétyle la glucosamine en C-6 côté non réducteur (Bloemberg et *al.*, 1994) tandis que la protéine NodX acétyle en C-6 la glucosamine côté réducteur (Davis et *al.*, 1988). La dernière, la protéine NolL, est une 3-*O* ou 4-*O*-acétyltransférase spécifique du fucose additionnel (Berck et *al.*, 1999 ; Corvera et *al.*, 1999).

Les substitutions correspondant à une N-méthylation et à une carbamoylation (sous contrôle des gènes nodS, nodU et nolO) :

La protéine NodS est une N-méthyltransférase (Geelen et *al.*, 1993 ; Jabbouri et *al.*, 1995), tandis que les protéines NodU et NolO contrôlent la carbamoylation respectivement en C-6 et C-3 (ou C-4), au niveau de la glucosamine non réductrice (Jabbouri et *al.*, 1995, 1998 ; D'Haeze et *al.*, 1999).

Les substitutions correspondant à une 2-O-méthylation (sous contrôle du gène noeI) :

la protéine NoeI est une 2-*O*-méthyltransférase spécifique du fucose additionnel en C-6 de l'extrémité réductrice des facteurs Nod (Jabbouri et *al.*, 1998).

II.2.3. Sécrétion des Facteurs Nod

Les protéines NodI et NodJ jouent un rôle important dans la sécrétion des facteurs Nod (Fernandez-Lopez et *al.*, 1996 ; Downie, 1998). Les gènes *nodI* et *nodJ* possèdent des homologies avec des gènes bactériens impliqués dans le transport de polysaccharides capsulaires (Vasquez et *al.*, 1993). Il est notable qu'une mutation de ces gènes n'affecte pas la nodulation. Les facteurs Nod sont supposés bénéficier d'autres transporteurs membranaires impliqués dans la sécrétion des polysaccharides (Downie, 1998), ou des ABC-transporteurs proches de NodI et NodJ (Spaank, 2000). D'autres gènes *nod* sont pressentis pour intervenir dans la sécrétion des facteurs Nod du fait de leur homologie avec des transporteurs

membranaires. C'est le cas du gène *nodT* (Rivilla et al., 1995) ou de *nolF*, *nolG*, *nolH*, *nolI* qui présentent des homologies avec des gènes codant des pompes d'efflux (Saier et al., 1994).

II.3. Les rôles et les interactions des flavonoïdes, des gènes nod et des facteurs Nod pour une symbiose réussie

La combinaison flavonoïdes - gènes de nodulation - facteurs Nod est la signature majeure de la symbiose rhizobium-Légumineuse à savoir sa spécificité.

II.3.1. Spécificité de symbiose

Un rhizobium donné n'est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote qu'avec un nombre limité d'espèces végétales, définies par son spectre d'hôtes. Inversement, une espèce de Légumineuse donnée ne pourra établir une association symbiotique qu'avec une ou plusieurs espèces ou genres de rhizobia, définissant ainsi le spectre d'hôtes de la légumineuse. Les variations d'amplitude des spectres d'hôtes bactériens et des Légumineuses sont donc très importantes. En effet, on observe des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988), alors que cette légumineuse possède d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*, Boivin et al., 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôtes modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec certaines espèces des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Krishnan & Pueppke, 1991). Enfin certains symbiotes à large spectre d'hôtes sont capables de noduler un très grand nombre de Légumineuses, tel *Sinorhizobium fredii* USDA257 capable de noduler plus de 77 genres de Légumineuses ou *Sinorhizobium* sp. NGR234 qui s'associe avec près de 112 genres (Pueppke & Broughton, 1999). Du côté du partenaire végétal, alors que certaines Légumineuses, comme le pois afghan ou *Galega orientalis*, nécessitent des dispositions particulières à la symbiose (Firmin et al., 1993 ; Terefework et al., 1998), d'autres espèces, telle que *Macroptilium atropurpureum* ou *Vigna unguiculata*, sont capables de s'associer avec de nombreuses espèces de rhizobia, et sont utilisées pour le piégeage et la caractérisation d'isolats de nodules (Somasegaran & Hoben, 1985 ; Lewin et al., 1987). Les études de spectre d'hôtes ont révélé qu'en proportion peu de rhizobia s'associaient à une seule espèce de Légumineuses, la plupart pouvant établir une symbiose avec différents partenaires végétaux (Tan et al., 1999 ; Perret et al., 2000 ; Zahran, 2001).

II.3.2. Rôle des flavonoïdes

Le rôle principal des flavonoïdes dans le dialogue moléculaire est leur capacité à induire ou à inhiber la transcription des gènes de nodulation.

Dans les phases les plus précoces de leur interaction avec des Légumineuses, les rhizobia affichent une variété de réponses à la présence de flavonoïdes dans la rhizosphère. Pour ne citer que les principaux exemples, certains composés sont chimioattractants pour les rhizobia et peuvent stimuler leur croissance, d'autres, induisant les gènes *nod*, peuvent également induire des gènes codant la synthèse et la libération de protéines du système de sécrétion de type I et de type III (Cooper, 2004). La structure des polysaccharides de surface peut être modifiée en présence de flavonoïdes. Par ailleurs, flavonoïdes et isoflavonoïdes peuvent être métabolisés par les rhizobia en une multitude de composés phénoliques poly- ou monocycliques dont certains possèdent également des propriétés inductrices ou inhibitrices des gènes *nod* (Cooper, 2004).

II.3.2.1. Reconnaissance des flavonoïdes par les rhizobia : la protéine NodD

La reconnaissance des plantes hôtes par les rhizobia repose donc sur la spécificité des protéines régulatrices bactériennes pour les flavonoïdes. Selon les flavonoïdes exsudés par la plante, l'expression des gènes *nod* peut être soit induite, soit réprimée (Perret et *al.*, 2000). La reconnaissance des flavonoïdes par les rhizobia est sous contrôle de régulateurs transcriptionnels (Schlaman et *al.*, 1998). La protéine NodD, codée par le gène *nodD*, appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels à motifs LysR, qui viennent se fixer sur des motifs conservés de 47 paires de bases dans la région promotrice des loci *nod*, appelée *nod-box* (Fisher et *al.*, 1988).

L'interaction de la protéine NodD avec les flavonoïdes conduirait à un changement de conformation de cette protéine permettant alors l'expression des gènes *nod* (Fig. 10, Chen et *al.*, 2005). Le nombre de copies du gène *nodD*, ainsi que l'affinité de la protéine pour différents flavonoïdes, est variable selon les souches de rhizobia (Gyorgypal et *al.*, 1991).

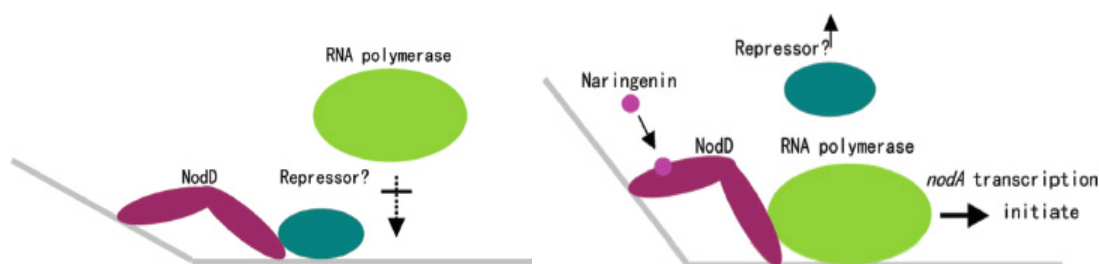


Figure 10. Modèle d'action de la protéine NodD.

Issue de Chen et *al.* (2005).

Dans certaines espèces, d'autres régulateurs transcriptionnels peuvent intervenir dans la reconnaissance des flavonoïdes. Le gène *syrM*, homologue de *nodD*, présent chez *S. meliloti* et *Sinorhizobium* sp. NGR234, est impliqué à la fois dans l'induction de la synthèse d'exopolysaccharides mais aussi dans la régulation de gènes *nod* (Mulligan & Long, 1989). *Bradyrhizobium japonicum* possède quant à lui deux systèmes régulateurs à deux composantes : NodV-NodW pouvant remplacer NodD (Loh et *al.*, 1997) et NwsA-NwsB, impliqués dans la voie de répression des gènes *nod* par quorum sensing (Loh et *al.*, 2002). Il est également à noter que des régulateurs négatifs existent parmi les rhizobia, tels NolA ou NolR, qui se fixent aux promoteurs des gènes *nod*, empêchant ainsi leur expression (Cren et *al.*, 1995 ; Loh & Stacey, 2001).

II.3.2.2. Inducteurs des gènes de nodulation

La possibilité de construire des fusions LacZ avec certains gènes requis pour la synthèse des facteurs Nod (gènes *nodA*, *nodB*, ou *nodC*) a permis de découvrir que la transcription de ces gènes nécessitait un ou des facteurs provenant de la plante hôte (Innes et *al.*, 1985 ; Mulligan & Long, 1985 ; Rossen et *al.*, 1985 ; Zaat et *al.*, 1987). Les premières flavones inductrices des gènes *nod* découverts en ce sens, ont été la lutéoline (Peters et *al.*, 1986) et la 7,4'-dihydroxyflavone (Redmond et *al.*, 1986), respectivement isolées de téguments de graines de *Medicago sativa* et de racines de *Trifolium repens*. Ces flavonoïdes sont inducteurs des gènes *nod* de *S. meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Très peu de temps après ces importantes découvertes, une flavone glycosylée, l'apigénine 7-O-glucoside, et une flavonone, l'ériodictyol isolées chez le pois (*Pisum sativum*) ont été identifiées comme inducteurs pour *R. leguminosarum* bv. *vicia* (Firmin et *al.*, 1986).

Des inducteurs provenant d'autres sous-classes de flavonoïdes telles que les chalcones, les flavonols, et les isoflavones, ont également été isolés à partir de diverses Légumineuses (Tableau I).

Tableau I. Inducteurs isolés à partir de Légumineuses.

Plantes	Flavonoïdes inducteurs isolés	Références
<i>Galega orientalis</i>	Chalcone non caractérisée	Suominen et al. (2003)
<i>Glycine max</i>	Formononétine, Biochanine A Coumestrol, Génistéine, Daidzéine Isoliquiritigénine Génistéine-7- <i>O</i> -glucoside, Génistéine-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -malonylglucoside), Daidzéine-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -malonylglucoside)	Djordjevic et al. (1987) Kosslak et al. (1987) Kape et al. (1992) Smit et al. (1992)
<i>Lupinus albus</i>	Acide érythronique, Acide tétronique	Gagnon & Ibrahim (1998)
<i>Macrotyloma geocarpum</i>	Daidzéine, Génistéine, Coumestrol	Dakora (2000)
<i>Medicago sativa</i>	Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside, Eriodictyol Lutéoline Liquiritigénine, 7,4'-dihydroxyflavone, Méthoxychalcone Chrysoeriol Stachydrine (bétaine), Trigonelline (bétaine)	Firmin et al. (1986) Peters et al. (1986) Maxwell et al. (1989) Hartwig et al. (1990) Phillips et al. (1992)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Delphinidine, Eriodictyol, Génistéine, Génistéine-3- <i>O</i> -glucoside, Kaempférol, Malvidine, Myricétine, Naringénine, Pétunidine, Quercétine Daidzéine, Génistéine, Coumestrol Daidzéine, Liquiritigénine, isoliquiritigénine, Coumestrol	Hungria et al. (1991a et b) Dakora et al. (1993a et b) Bolanos-Vasquez & Werner (1997)
<i>Sesbania rostrata</i>	Liquiritigénine	Messens et al. (1991)
<i>Trifolium repens</i>	7,4'-dihydroxyflavone, Géraldone, 4'-hydroxy-7-méthoxyflavone 7,4'-Dihydroxyflavone, Umbelliférone, Formononétine	Redmond et al. (1986) Djordjevic et al. (1987)
<i>Vicia sativa</i>	3,5,7,3'-tétrahydroxy-4'-méthoxyflavanone, 7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone 3,5,7,3'-Tétrahydroxy-4'-méthoxyflavanone, 7,3'-Dihydroxy-4'-méthoxyflavanone, 2',4',4'- Trihydroxychalcone, 4',4-Dihydroxy-2'- méthoxychalcone, Naringénine, Liquiritigénine, 7,4'-Dihydroxy-3'-méthoxyflavanone, 5,7,4'- Trihydroxy-3'-méthoxyflavanone, 5,7,3'- Trihydroxy-4'-méthoxyflavanone	Zaat et al. (1989) Recourt et al. (1991)
<i>Vigna subterranea</i>	Daidzéine, Génistéine, Coumestrol	Dakora & Muofhe (1996)
<i>Vigna unguiculata</i>	Daidzéine, Génistéine, Coumestrol	Dakora (2000)

L'association de plusieurs flavonoïdes inducteurs peut être plus efficace qu'un flavonoïde seul. En effet, des effets synergiques de l'induction de l'ériodictyol et de la naringénine avec

la génistéine, ainsi que de la liquiritigénine ou de l'isoliquiritigénine avec la daidzéine ont été observés pour *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Bolanos-Vasquez & Werner, 1997 ; Hungria et al., 1992). L'hespérétine combinée à la naringénine génèrent également des niveaux d'expression des gènes nod plus importants que chacun des composés testés séparément (Begum et al., 2001). Il faut néanmoins signaler que certains flavonoïdes agissent comme antagonistes (anti-inducteurs) de l'induction des gènes nod par d'autres flavonoïdes (Firmin et al., 1986 ; Djordjevic et al., 1987 ; Peters & Long, 1988 ; Kossak et al., 1990 ; Zuanazzi, 1998).

Le fait que les inducteurs et les anti-inducteurs soient souvent présents ensemble dans les exsudats racinaires d'une seule espèce de Légumineuses suggère que *in vivo* le niveau d'induction des gènes nod est la conséquence d'effets positifs et d'effets négatifs des flavonoïdes (Jain & Nainawatee, 2002 ; Rolfe et al., 1988 ; Zuanazzi et al., 1998). Des composés qui sont inducteurs pour certains rhizobia peuvent être anti-inducteurs pour d'autres : les isoflavones génistéine et daidzéine sont inductrices de l'expression des gènes nod chez *B. japonicum* et *Rhizobium* sp. NGR234, mais sont anti-inducteurs pour *R. leguminosarum* bv. *trifolii* et bv. *vicia*.

II.3.3. Les facteurs Nod

Les facteurs Nod, de nature chitolipooligosaccharidique, sont des signaux essentiels pour l'entrée des rhizobia au sein des racines de Légumineuses (Relic et al., 1994). Le succès, ou non, du processus d'infection est en grande partie déterminé par leurs caractéristiques structurales.

II.3.3.1. Reconnaissance des facteurs Nod par la plante-hôte

L'application de concentrations nano ou femtomolaires de facteurs Nod purifiés sur les racines d'une légumineuse hôte appropriée provoque différentes réponses pouvant être détectées par des analyses biochimiques, moléculaires et/ou microscopiques :

- une déformation des poils absorbants (Lerouge et al., 1990) accompagnée d'une dépolarisation de leur membrane plasmique (Ehrhardt et al., 1992 ; Felle et al., 1995),

- de rapides augmentations des oscillations du calcium intracellulaire libre dans les poils absorbants, souvent référencées comme pics de calcium (Ehrhardt et *al.*, 1996 ; Gehring et *al.*, 1997 ; Wais et *al.*, 2000, 2002),
- des modifications du cytosquelette du poil absorbant (Cardenas et *al.*, 1998 ; Timmers, 1998),
- la formation de cordons d'infection dans les poils absorbants déformés (Van Brussel et *al.*, 1992),
- la formation d'un primordium nodulaire par divisions des cellules du cortex (Lopez-Lara et *al.*, 1995, Spaink, 2000).

La nature de la voie de transduction du signal, menant de la perception des facteurs Nod à l'activation des gènes en relation avec la symbiose (Fig. 11), a fait l'objet de nombreuses recherches (Cullimore et *al.*, 2001 ; Oldroyd, 2001 ; Goedhart et *al.*, 2003 ; Limpens & Bisseling, 2003 ; Oldroyd & Downie, 2006).

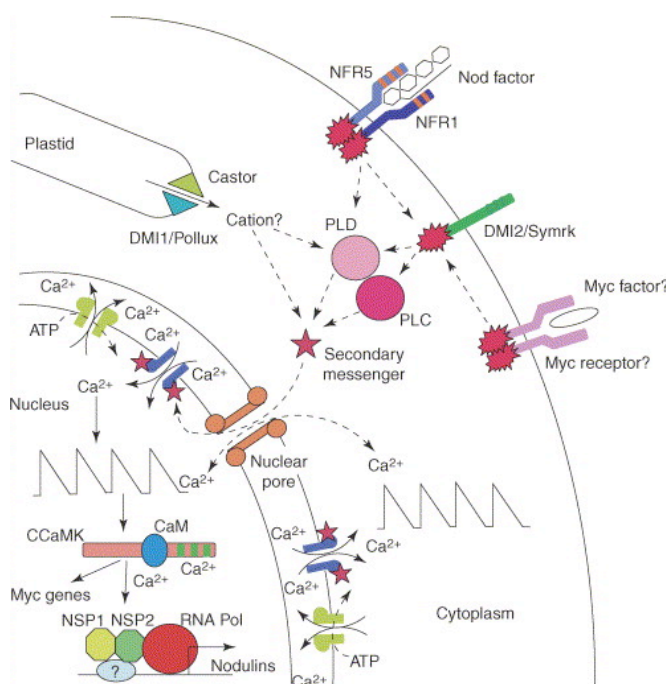


Figure 11. Reconnaissance et transduction du signal « facteur Nod » chez la plante modèle *Lotus japonicum*.

De nombreux composants de la voie de transduction du signal ont été identifiés chez les Légumineuses. Notamment, les deux kinases à domaine récepteur NFR1 et NFR5 sont impliquées dans la reconnaissance spécifique des facteurs Nod. Les messagers secondaires incluent des phospholipases C et D (PLC et PLD) et des changements des concentrations cytosolique et nucléaire en calcium. L'activation d'une kinase via une calmoduline entraîne l'expression des gènes de nodulines par l'intermédiaire des régulateurs transcriptionnels NSP1 et NSP2.

Issue de Oldroyd et Downie (2006).

Une avancée scientifique a été réalisée avec la découverte d'un gène codant une « symbiosis receptor-like kinase » (SYMRK) chez *Lotus* (Stracke et al., 2002) et une « nodulation receptor kinase » (NORK) chez *Medicago* (Endre et al., 2002) nécessaires pour la transduction d'un signal précoce lors des symbioses rhizobienne et mycorhizienne. Plus récemment, deux gènes codant des LysM receptor-like kinases, intervenant en amont de SYMRK ont été découverts chez *Lotus japonicum* et pourraient coder les récepteurs directs des facteurs Nod rhizobiens (Madsen et al., 2003 ; Radutoiu et al., 2003). De même, chez *Medicago truncatula*, deux gènes de récepteur-like kinase ont été identifiés comme codant de potentiels récepteurs de facteurs Nod (Limpens et al., 2003).

II.3.3.2. Rôle des facteurs Nod dans la spécificité d'hôtes

L'étroite relation entre la structure des facteurs Nod et la spécificité d'hôte des rhizobia a été démontrée par de nombreux travaux combinant deux approches complémentaires. La première consiste à muter les gènes codant les substitutions chimiques des facteurs Nod, puis à observer d'une part, la structure du facteur Nod résultant de la mutation, et d'autre part, les variations de spécificité d'hôtes de la souche. La seconde approche porte sur les relations taxonomie-structure-spécificité par comparaison des structures de facteurs Nod et de la spécificité de souches taxonomiques différentes mais isolées d'une même plante ou d'un même genre de plante.

Longueur de la chaîne oligosaccharidique :

Il a été montré que seul le gène *nodC* contrôlait la longueur de la chaîne oligosaccharidique (entre 3 et 5 résidus suivant les souches). Ce gène jouerait donc un rôle dans la spécificité dans la mesure où la longueur des facteurs Nod intervient dans la spécificité d'hôtes (Kamst et al., 1997, 1999, 2000 ; Roche et al., 1996).

Spécificité de la chaîne d'acyle :

Les études de spécificité des rhizobia révèlent que les déterminants de la spécificité au niveau de la chaîne d'acyl dépendent à la fois de sa structure (liaison $\alpha\beta$ ou non), de sa longueur et de son nombre de doubles liaisons (Ardourel et al., 1994 ; Bloemberg et al., 1995 ; Yang et al., 1999). A titre d'exemple, toutes les souches synthétisant des facteurs Nod avec une chaîne d'acyl $\alpha\beta$ insaturée (sous contrôle des enzymes NodE et NodF) nodulent des Légumineuses

de la tribu des *Galegeae* (*Astragalus*, *Galega*, *Medicago*, *Oxytropis*, *Trifolium*, *Vicia*) (Yang et al., 1999 ; Poinso et al., 2001).

Spécificité des substitutions à l'extrémité non réductrice :

La présence d'un groupement N-méthyl à l'extrémité non réductrice (sous le contrôle de la protéine NodS) joue un rôle dans la spécificité de *Azorhizobium caulinodans*, *Sinorhizobium* sp. NGR234 et *Rhizobium tropici* pour noduler *Leucaena leucocephala* ou *Phaseolus vulgaris* (Lewin et al., 1990; Waelkens et al., 1995). Les autres substitutions (acétate, carbamate) ne joueraient qu'un rôle modéré dans le spectre d'hôtes dans la mesure où leur absence n'entraîne qu'un court délai dans la nodulation (Perret et al., 2000).

Spécificité des décorations à l'extrémité réductrice :

Des déterminants de spécificité, principalement des glycosylations, ont été décrits à l'extrémité réductrice des facteurs Nod. A titre d'exemple, évoquons le cas de la fucosylation. Toutes les souches nodulant *Sesbania* (souches d'*Azorhizobium* et *Sinorhizobium*) nécessitent la synthèse de facteurs Nod fucosylés et arabinosylés à l'extrémité réductrice pour une nodulation effective de leur plante hôte (D'Haeze et al., 2000). De même, la nodulation de *Glycine max* et du siratro par *Bradyrhizobium japonicum* requiert la présence d'un résidu fucose (substitué par un méthyl pour *Glycine max*) à l'extrémité réductrice des facteurs Nod (Stacey et al., 1994 ; Stokkermans et al., 1995). De plus il a été montré que les substitutions additionnelles présentes sur le fucose (méthyl, acétyl et/ou sulfate) jouaient un rôle important sur la spécificité (Hanin et al., 1997 ; Berck et al., 1999 ; Corvera et al., 1999 ; Pueppke & Broughton, 1999). Certains auteurs suggèrent par ailleurs que la position de certaines substitutions sur le squelette des facteurs Nod et bien plus importante que la nature même de ces substitutions (Ovtsyna et al., 2000).

Enfin, certaines substitutions chimiques sur les facteurs Nod, telle que la sulfatation, pourraient avoir des effets protecteurs contre leur propre dégradation, contre les chitinases d'origine végétales notamment (D'Haeze et al., 2000 ; Ovtsyna et al., 2000).

II.4. Conclusion

Outre l'entrée des rhizobia à l'intérieur des racines et l'induction d'un primordium nodulaire via la reconnaissance des facteurs Nod, d'autres facteurs sont nécessaires pour les étapes précoces ou plus tardives du processus d'infection. Ces étapes s'échelonnent depuis la propagation du cordon d'infection et l'entrée des rhizobia dans le cytoplasme des cellules infectées jusqu'à la mise en place des échanges des métabolites entre les deux partenaires. Pour ne citer que deux exemples, les polysaccharides ainsi que les systèmes de sécrétion des protéines jouent également des rôles majeurs dans la mise en place de la symbiose.

III. Etat d'avancement des connaissances sur la symbiose *Methylobacterium nodulans* – *Crotalaria podocarpa*

III.1. Les Crotalaires

Les légumineuses du genre *Crotalaria* (Fig. 12), comptant près de 600 espèces, appartiennent à la sous-famille des *Papilionoideae*, tribu des *Crotalarieae* qu'elles partagent, entre autres, avec les genres *Aspalathus* et *Lotononis* (Allen & Allen, 1981 ; Polhill, 1982). Les crotalaires sont des herbacées annuelles ou pérennes, parfois des arbustes. Les représentants de ce vaste genre sont bien répartis dans les régions tropicales et chaudes des deux hémisphères, mais sont les plus nombreux à l'ouest et au sud de l'Afrique tropicale.

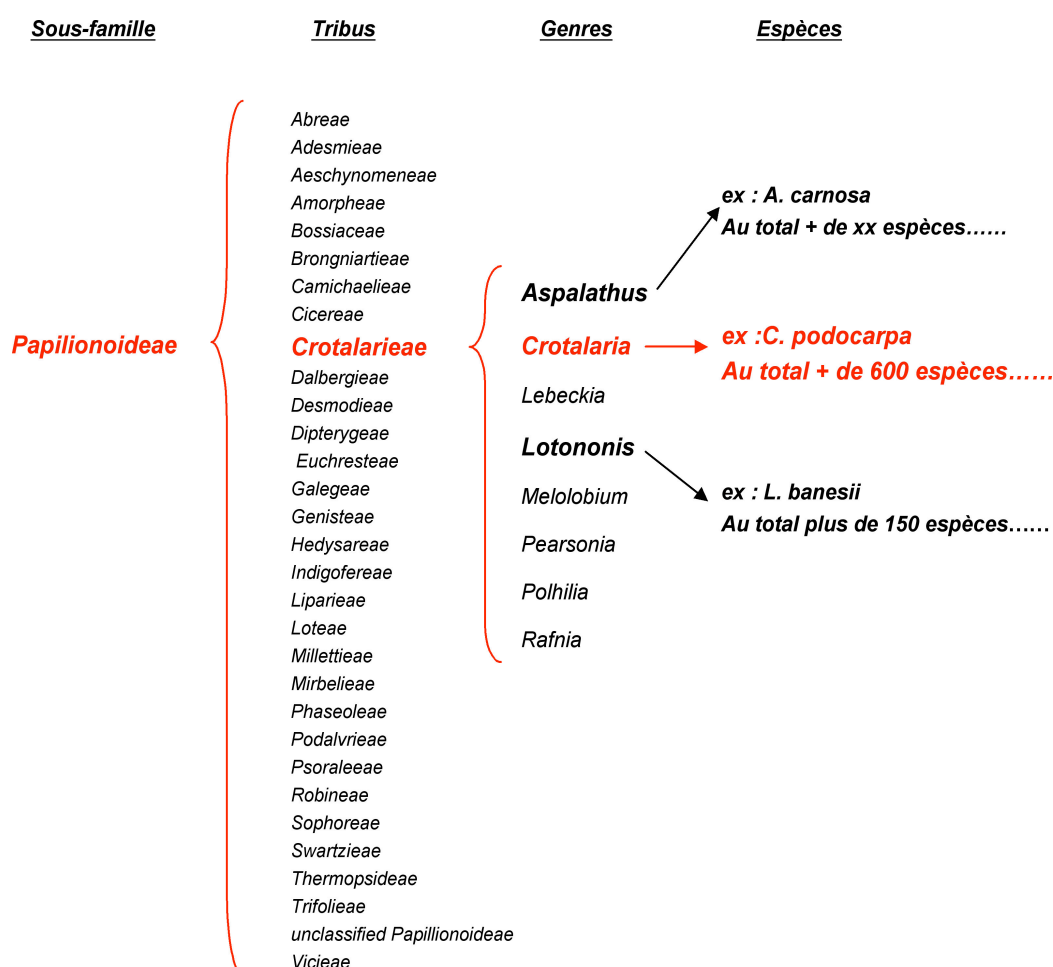


Figure 12. Place du genre *Crotalaria* dans la phylogénie des Légumineuses.

III.1.1. Utilisation des Crotalaires

Les utilisations des crotalaires sont multiples (plantes fourragères, fertilisant azoté, engrais vert...). Un de leur intérêt majeur est que de nombreuses espèces sont résistantes aux nématodes phytoparasites des plantes cultivées. Cette résistance peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

- soit en empêchant ou en limitant la reproduction et le développement des nématodes (Godfrey, 1928 ; Sano *et al.*, 1983 ; Silva *et al.*, 1989a et b, 1990a et b ; Gonzaga & Ferraz, 1994 ; Desaeager & Rao, 1999 ; Jourand *et al.*, 2004b et c) notamment par la présence d'exsudats racinaires némato-répulsifs empêchant les nématodes de pénétrer les racines (Villar & Zavaleta-Mejia, 1990).
- soit par la toxicité de leurs sécrétions racinaires ainsi que par la présence de substances nématocides - notamment des alcaloïdes de type pyrrolizidinique (Mears & Mabry, 1971 ; Kinghorn & Smolenski, 1981) - dont la toxicité envers les vertébrés a été démontrée (Deleve *et al.*, 1996 ; Arzt & Mount 1999) dans leurs tissus végétaux (graines, feuilles, racines) (Villar & Zavaleta-Mejia, 1990 ; Subramaniyan & Vadivelu, 1990 ; Jasy & Koshy, 1992 ; Sellami & Mouffarrah 1994).
- soit en favorisant la croissance de nématodes bactéricivores, antagonistes des nématodes phytoparasites, ainsi que le développement de certains micro-organismes pathogènes (bactéries ou champignons) et d'insectes parasites ou prédateurs des nématodes (Wang *et al.*, 2002).

La culture de ces espèces résistantes comme plantes d'assolement permet donc de réduire sensiblement certaines populations de nématodes dans les sols cultivés (Daesenger & Rao, 2000).

III.1.2. Méthodes de cultures des Crotalaires

Grâce à leur potentiel fixateur d'azote, de nombreuses espèces ont été utilisées comme fertilisant azoté (Sandanam *et al.*, 1976 ; Becker & Jonhson, 1998 ; Fischler *et al.*, 1999) combinant ainsi des propriétés phytochimiques et d'engrais vert.

Ainsi, les crotalaires peuvent être utilisées comme plantes de couverture lors de la rotation des cultures. Elles constituent alors des cultures préventives avant la mise en place d'une culture sensible. De nombreuses études ont montré que cette méthode était particulièrement efficace

contre les phytoparasites notamment Huang et *al.* (1981) sur la culture de carottes et Wang (2002) sur les cultures d'ananas.

Les crotalaires peuvent également être utilisées en culture intercalaire. Contrairement à la technique précédente, la culture intercalaire consiste à cultiver la crotalaire en même temps que la culture de production. Cette pratique culturale s'est révélée efficace en diminuant certaines populations de phytoparasites et en améliorant significativement les rendements des récoltes concernées notamment dans les vergers de pêchers (Mac Beth & Taylor, 1944) et dans les baneraies (Choudoury et *al.*, 1998).

Enfin, les crotalaires peuvent être valorisées comme amendement ou engrais vert. L'utilisation comme engrais vert d'une culture de crotalaires constitue en un assolement suivi de l'incorporation de la plante dans le sol. Outre l'apport en éléments minéraux, cette technique semble aussi très efficace pour réduire les populations de phytoparasites (Sharma & Scolari, 1984 ; Gongaza & Ferraz, 1994 ; Rich & Rahi, 1995). Cela a été décrit sur les cultures industrielles de tabac (*Nicotiana tabacum*) (Patel et *al.*, 1988), sur les plantations de canne à sucre (*Saccharum officinarum*) (Moura, 1991), ou encore les cultures de tomates (*Lycopersicon esculentum*) (Rich & Rahi, 1995 ; Esparrago et *al.*, 1999).

III.1.3. Crotalaires et substances naturelles

Plusieurs espèces de crotalaires ont fait l'objet de nombreuses études pour leur toxicité quant aux métabolites secondaires qu'elles produisent (Allen & Allen, 1981 ; Polhill, 1982). Les crotalaires sont des plantes productrices de substances naturelles biologiquement actives. Dès 1935, Neal et *al.* ont isolé un alcaloïde de *C. spectabilis*, la monocrotaline puis, cet alcaloïde a été montré responsable du crotalisme, maladie qui affecte le système nerveux, les poumons et le foie, entraînant la mort des animaux. A cette même période, déjà plus de 20 espèces étaient connues pour empoisonner les ruminants (Watt & Breyer-Bradwijk, 1962 ; Verdcourt & Trump, 1969). Depuis lors, près de 50 alcaloïdes de type pyrrolizidinique ont été isolés à partir de 45 espèces de crotalaires (Mears & Mabry, 1971 ; Willette & Cammarato, 1972 ; Kinghorn & Smolenski, 1981 ; Polhill, 1982).

Outre ce type de composés, les crotalaires sont connues pour produire d'autres molécules biologiquement actives comme les flavonoïdes (Tableau II), acteurs majeurs dans le dialogue moléculaire se mettant en place lors de la symbiose entre le partenaire végétal et le partenaire bactérien.

Tableau II. Liste non exhaustive des flavonoïdes identifiés chez les crotalaires.

Espèces	Flavonoïdes	Noms	Références
<i>C. anagyroides</i>	Flavones	Apigénine Isovitexine	Subramanian & Nagarajan (1967)
<i>C. angulata</i>	Flavones	Anacrotine Vitexine Orientine	Nair et al. (1988)
<i>C. laburnifolia</i>	Flavones	Aromadendrine glycosylée Orientine Iso-orientine Quercétine- <i>O</i> -galactoside	Yadava (1993) Subramanian & Nagarajan (1968)
<i>C. madurensis</i>	Isoflavones	Crotalarine Crotarine	Chaturvedi & Chaturvedi (1987)
	Chalcones	Crotamidine	Bhakuni et al. (1984)
	Isoflavones	Dihydroalpinumisoflavone	
	Flavones	4',5,7-trihydroxy-3-méthoxyflavone	
<i>C. medicagenia</i>	Chalcone		Settings (2005)
<i>C. orixensis</i>	Chalcone	Crotaorixine	Settings (2005)
<i>C. pallida</i>	Isoflavones	2'-hydroxydaidzeine Daidzéine 2'-hydroxygenisteine	Ko et al. (2004)
	Flavones	Apigénine	Subramanian & Nagarajan (1970)
<i>C. paniculata</i>	Flavones	Apigénine	
		Dérivés glycosylés de l'apigénine	
<i>C. prostrata</i>	Chalcones	Crotaoprostine Dérivés de crotamine Dérivés de crotamosmine Dérivés de crotine	Krohn et al. (2002)
<i>C. podocarpa</i>	Flavones	Acacétine 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -apiofuranosyl (1-6) β -glucopyranoside Apigénine 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -apiofuranosyl (1-6) β -glucopyranoside	Wanjala & Majinda (1999)
<i>C. ramosissima</i>	Chalcones	Crotamosmine Crotamine Crotine	Rao et al. (1998)
<i>C. retusa</i>	Flavones	Quercétine Vitexine 4'- <i>O</i> -galactoside	Subramanian & Nagarajan (1969)
<i>C. semperflorens</i>	Flavones	Crosemperine Kaempéritine Kaempférol Lepidoside	Dhasmana & Garg (1991)
<i>C. sessiflora</i>	Isoflavones	2',4',5,7-tetrahydroxyisoflavone	Yoo et al. (2004)
	Flavones	2',4',7-trihydroxyflavone 4',7-dihydroxyflavone	
		Isovitexine	
<i>C. striata</i>	Flavones	Apigénine Lutéoline Vitexine Vitexine- <i>O</i> -xyloside	Subramanian & Nagarajan (1967, 1969)
<i>C. thebaica</i>	Flavones	2'',6''-diacetylvitexine 6''-di- <i>O</i> -acetylorientine Iso-orientine Orientine Vitexine	Zedan (1994)
<i>C. verrucosa</i>	Flavones	3',4'-dimethylquercétine Vitexine Isovitexine Vitexine 4'-xyloside Kaempferol 7,4'-di- <i>O</i> - <i>L</i> -rhamnopyranoside	Yadava & Mathews (1994) Subramanian & Nagarajan (1967)

III.2. Les *Methylobacterium*

Le genre *Methylobacterium* a été défini par Patt et al. (1976). Il regroupe aujourd'hui 25 espèces présentées dans le tableau III. Les bactéries appartenant au genre *Methylobacterium* font partie des α -protéobactéries (Hiraishi et al., 1995).

Tableau III. Les différentes espèces de *Methylobacterium* identifiées à ce jour.

Espèces de <i>Methylobacterium</i>	Références
<i>M. rhodinum</i>	Heumann (1962), Green & Bousfield (1983)
<i>M. radiotolerans</i>	Ito & Lizuka (1971), Green & Bousfield (1983)
<i>M. organophilum</i>	Patt et al. (1976), révisé par Skerman et al. (1980)
<i>M. mesophilicum</i>	Austin & Goodfellow (1979), Green & Bousfield (1983)
<i>M. extorquens</i>	Bousfield & Green (1985)
<i>M. fujisawaense</i>	Green et al. (1988)
<i>M. rhodesianum</i>	Green et al. (1988)
<i>M. zatmanii</i>	Green et al. (1988)
<i>M. aminovorans</i>	Urakami et al. (1993)
<i>M. thiocyanatum</i>	Wood et al. (1998)
<i>M. dichloromethanicum</i>	Doronina et al. (2000)
<i>M. chloromethanicum</i>	MacDonald et al. (2001)
<i>M. lusitanum</i>	Doronina et al. (2002)
<i>M. suomiense</i>	Doronina et al. (2002)
<i>M. nodulans</i>	Jourand et al. (2004a)
<i>M. populi</i>	Van Aken et al. (2004)
<i>M. aquaticum</i>	Gallego et al. (2005a)
<i>M. hispanicum</i>	Gallego et al. (2005a)
<i>M. isbiliense</i>	Gallego et al. (2005b)
<i>M. variabile</i>	Gallego et al. (2005c)
<i>M. adhaesivum</i>	Gallego et al. (2006)
<i>M. podarium</i>	Anesti et al. (2006)
<i>M. jeotgali</i>	Aslam et al. (2007)
<i>M. oryzae</i>	Madhaiyan et al. (2007a)
<i>M. salsuginis</i>	Wang et al., (2007)

Les *Methylobacterium* sont des petits bacilles courts, isolés ou en rosettes, souvent mobiles polaires, Gram négatif, catalase positive, oxydase faiblement positive, présentant parfois des grains d'accumulation de β -hydroxypolybutyrate (Green, 1992). Sur milieu solide, leurs colonies, de taille variant de 1 à 3 mm de diamètre, sont pigmentées en rose à cause de la production de caroténoïdes.

Les *Methylobacterium* se retrouvent dans de nombreux milieux riches et ont notamment été isolés de l'air, d'eaux douces, du sol, de poussières, de sédiments lacustres, de surfaces de feuilles, de nodules racinaires, de produits alimentaires et pharmaceutiques (Corpe & Basile, 1982 ; Green, 1992 ; Holland, 1997 ; Sy et al., 2001a, b ; Jaftha et al., 2002). Leur capacité à

croître sur tous les milieux contenant des composés mono- et poly-carbonés, mais également leur résistance aux produits chlorés (Hiraishi *et al.*, 1995) et aux rayons gamma (Ito & Lizuka, 1971), font que les *Methylobacterium* sont des bactéries difficiles à éliminer. Ceci pose parfois des problèmes de contamination, notamment dans les hôpitaux (Gilardi & Faur, 1984 ; Kayle *et al.*, 1992 ; Hiraishi *et al.*, 1995 ; Hornei *et al.*, 1999).

III.2.1. La méthylotrophie : une fonction métabolique particulière

La méthylotrophie est définie comme la capacité à “*grow at the expense of reduced carbon compounds containing one or more carbon atoms but containing no carbon-carbon bonds*” (Anthony, 1982).

Une des caractéristiques métaboliques principales des *Methylobacterium* est donc leur capacité à utiliser des composés mono-carbonés comme le méthanol, le formaldéhyde, le formate et la méthylamine pour se développer sur un milieu minimum. Cette fonction métabolique est appelée méthylotrophie, elle est facultative chez les *Methylobacterium*. C’est la raison pour laquelle le nom commun de « Pink Pigmented Facultative Methylophilic bacteria » (PPFM) a été attribué aux bactéries appartenant au genre *Methylobacterium*, pigmentées en rose et méthylotrophes (Anthony, 1982 ; Green, 1992).

La figure 13 représente la séquence de réactions successives d’oxydation du méthanol en formaldéhyde chez les bactéries méthylotrophes dont font partie les *Methylobacterium* (Hanson & Hanson, 1996). La dégradation du méthanol en formaldéhyde s’effectue grâce à une enzyme périplasmique, la méthanol-déshydrogénase (MDH) (Anthony, 1992). C’est une protéine tétramérique de configuration $\alpha_2\beta_2$ dont chaque sous-unité α et β fait respectivement 66 et 9 Kda (Nunn *et al.*, 1989).

La méthylotrophie est un exemple surprenant de capacités métaboliques microbiennes, avec l'utilisation d'une classe de produits chimiques ignorés par la majorité des organismes. Bien que la capacité de croître de manière méthylotrophique ait été découverte au début des années 1900, ce n'est que dans les années 1960 à 1970 que la compréhension de la nature biochimique de cette propriété a commencé à apparaître (Anthony, 1982).

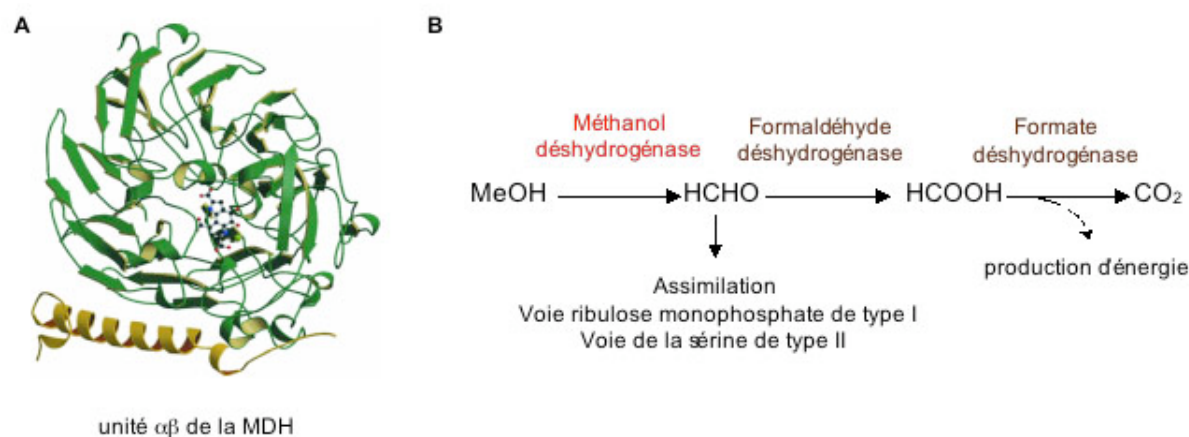


Figure 13. Oxydation du méthanol chez les bactéries méthylotrophes.

A. Unité αβ de la méthanol déshydrogénase (MDH). B. Séquence de réactions d'oxydation du méthanol.

A l'heure actuelle, l'état d'avancement de l'ensemble des connaissances acquises chez *M. extorquens*, permet d'élaborer un schéma de la fonction méthylotrophique beaucoup plus complet mais aussi très complexe (Fig. 14, Chistoserdova et al., 2003).

III.2.2. La relation plante-*Methylobacterium*

L'association non-pathogène de bactéries appartenant au genre *Methylobacterium* avec des plantes est rapportée par plusieurs auteurs (Basile et al., 1969 ; Austin et al., 1978 ; Austin & Goodfellow, 1979 ; Yoshimura, 1982 ; Corpe & Basile, 1982 ; Corpe & Rheems, 1989). Cette association est probablement distribuée sur toutes les espèces végétales. Des souches de *Methylobacterium* ont été isolées sur plus de 100 espèces de plantes, appartenant aux Bryophytes, aux Gymnospermes et aux Angiospermes (Holland, 1997 ; Sy et al., 2001a et b ; Jaftha et al., 2002). L'étude de cette association a permis de mettre en évidence plusieurs rôles attribués aux *Methylobacterium*.

Issue de Chistoserdova et *al.* (2003).

III.2.2.1. Rôle dans la germination des graines

Des graines de plantes traitées avec des suspensions de *Methylobacterium* présentent des taux de germination supérieurs à ceux des graines non traitées (Holland et al., 1992 ; Holland & Polacco, 1994 ; Abanda-Nkpwatt et al., 2006). Cette amélioration des taux de germination est due à la sécrétion par les *Methylobacterium* de substances favorisant la croissance des plantes, notamment certaines cytokinines comme la zéatine et la zéatine-riboside (Ivanova et al., 2000 ; Lidstrom & Chistoserdova, 2002 ; Senthilkumar et al., 2007). Certaines souches de *Methylobacterium* sont également productrices d'auxines, phytohormones stimulant la croissance des plantes (Ivanova & Doronina, 2001 ; Doronia et al., 2002 ; Madhaiyan et al., 2007b).

III.2.2.2. Rôle dans la croissance des plantes

Les *Methylobacterium* colonisant une plante se retrouvent sur des tissus foliaires, sous la cuticule, voire à l'intérieur du méristème (Holland, 1997 ; Zabetakis, 1997). Ces auteurs ont démontré que la relation *Methylobacterium*-plante n'était pas pathogène mais mutualiste : la présence des bactéries méthylotrophes permet de métaboliser le méthanol produit lors de la dégradation des pectines méthylées constitutives des végétaux, ceci lorsque la plante est en état de stress. L'utilisation du méthanol produit par la dégradation des tissus de la plante favorise la croissance et le développement des *Methylobacterium* ce qui engendre une augmentation de la production de cytokinines et d'auxines. Ces substances produites en retour par les bactéries sont alors bénéfiques à la plante pour régénérer ses tissus (Musanje et al., 1996 ; Holland, 1997).

III.2.2.3. Rôle dans le métabolisme azoté

Les *Methylobacterium* peuvent jouer un rôle direct dans le métabolisme azoté des plantes. Ainsi, certaines plantes sécrètent une enzyme, l'uréase, qui leur permet d'utiliser l'urée comme source d'azote en la métabolisant en ammonium. Sur des plantes mutées, ayant perdu la faculté de sécréter l'uréase, il a été montré que les *Methylobacterium* étaient capables de prendre le relais : les bactéries sécrètent leur propre uréase et rétablissent ainsi la possibilité pour la plante d'utiliser l'urée comme source d'azote (Holland et al., 1992 ; Polacco & Holland, 1993 ; Holland & Polacco, 1994 ; Holland, 1997 ; Doronia et al., 2000).

III.3. Des bactéries méthylotrophes appartenant au genre *Methylobacterium* nodulent et fixent l'azote en symbiose avec des Légumineuses

En 2001, Sy et al. (2001b), publiaient une étude de diversité de la communauté rhizobienne à partir de 8 espèces de *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoides*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* et *C. retusa*) poussant au Sénégal. L'étude de la nodulation et de la fixation sur ces espèces de *Crotalaria*, a montré qu'il existait deux groupes de spécificité bien distincts au sein de ce genre. Le groupe I est nodulé uniquement par des souches à croissance rapide très spécifiques, alors que le groupe II, non spécifique, est nodulé par des souches à croissance lente ainsi que par des *Bradyrhizobium* typiques isolés d'autres Légumineuses tropicales.

La comparaison des profils protéiques par SDS-PAGE montrait alors que les souches à croissance lente se regroupaient avec les *Bradyrhizobium*, alors que les souches à croissance rapide constituaient un groupe homogène différent des autres rhizobia connus. Une analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S (ARDRA) de souches représentant ce groupe ne donna qu'un seul type de profil par enzyme, confirmant sa forte homogénéité.

Lors du séquençage de l'ADNr 16S, il a été rapporté que ce dernier était phylogénétiquement très proche de celui des souches représentantes du genre *Methylobacterium* (Sy et al., 2001a et b). Or, jusqu'alors, il n'avait jamais été décrit d'association formant des nodules fixateurs d'azote avec des Légumineuses pour les bactéries appartenant au genre *Methylobacterium*.

La nature méthylotrophique des isolats a été confirmée par leur capacité à croître en présence de méthanol comme seule source de carbone et par la présence du gène *mxoF* codant la petite sous-unité de l'enzyme méthanol-déshydrogénase. Le séquençage de l'ADN du gène *mxoF* de la souche ORS 2060 a par ailleurs montré une forte identité avec la séquence du gène *mxoF* de *M. extorquens* et de *M. organophilum*. De plus, pour confirmer la capacité à noduler les légumineuses, le gène *nodA* a été recherché car ce gène est présent de façon constante chez tous les rhizobia, mais encore jamais décrit chez des *Methylobacterium* (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995 ; Dénarié et al., 1996). Le gène *mxoF* a bien été détecté chez le groupe de souches décrites précédemment (Sy et al., 2001a et b) et il a été séquençé pour la souche ORS 2060.

III.3.1. La symbiose *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa*

Cette capacité inhabituelle, pour les rhizobia, de métaboliser des composés en C₁ et, pour les bactéries du genre *Methylobacterium*, d'entrer en symbiose avec des Légumineuses en formant des nodules fixateurs d'azote, ont conduit les auteurs à proposer une nouvelle espèce bactérienne : *Methylobacterium nodulans* sp. nov. dont la souche type est ORS 2060 isolée de *Crotalaria podocarpa* (Jourand et al., 2004a). Cette souche constituait ainsi une nouvelle branche de bactéries nodulantes (Fig. 15).

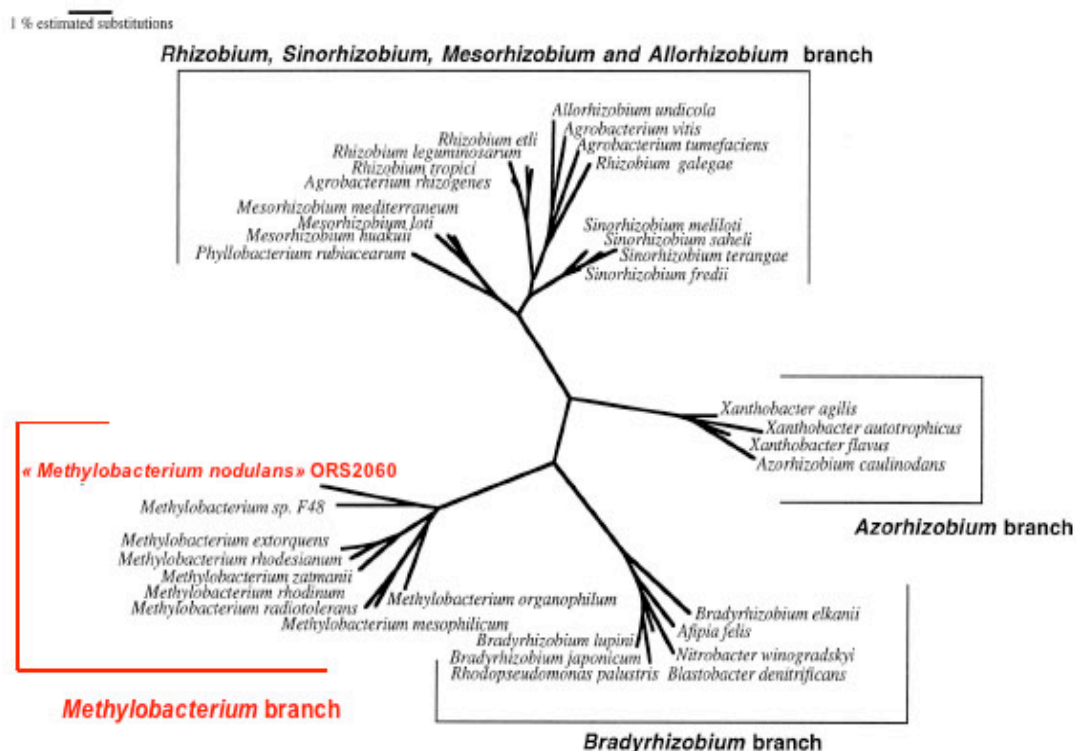


Figure 15. Arbre phylogénétique non enraciné montrant les différentes branches des rhizobia, incluant la nouvelle espèce “*M. nodulans*” dans la subdivision des α-protéobactéries.

L'arbre a été construit en utilisant la méthode de neighbor-joining à partir des séquences entières d'ADNr 16S. Les numéros d'accèsion GenBank/EMBL sont les suivants (la première lettre du genre et de l'espèce sont données entre parenthèses): D 12790 (Pr), D12797 (Mh), X67229 (Ml), L38825 (Mmed), X67224 (Ar), X67234 (Rt), U29386 (Rl), U28916 (Re), Y17047 (Au), X67225 (Av), X67223 (At), X67226 (Rg), X67222 (Sm), X68390 (Ss), X68387 (St), X67231 (Sf), X94198 (Xag), X94201 (Xau), X94199 (Xf), D11342 (Ac), U35000 (Be), M65248 (Af), L11661 (Nw), S46917 (Bd), D25312 (Rp), D12781 (Bj), U69637 (Bl), D32226 (Mo), D32225 (Mmes), D32227 (Mrad), D32229 (Mrhodi), D32230 (Mz), D32228 (Mrhode), D32224 (Me), D32236 (Msp), and AF220763 (Mn).

D'après Sy et al. (2001a).

III.3.2. Autres souches de *Methylobacterium* entrant en symbiose avec des Légumineuses

En 1958, Norris décrivait déjà une souche nodulante, pigmentée, obtenue à partir des racines de *Lotononis bainesii*. La nature chimique du pigment de cette souche a été déterminée par Kleinig et Broughton (1982) comme appartenant à la famille des caroténoïdes ce qui a conduit les auteurs à rapprocher ces souches des espèces de *Pseudomonas*. La comparaison des profils protéiques d'une collection d'isolats bactériens, obtenus à partir de nodules racinaires de *Lotononis baneisii*, a plus tard été réalisée (Dagutat, résultats non publiés ; Jaftha et al., 2002). Ces isolats formaient un cluster « étroit », nettement séparé des autres souches de rhizobia de référence. Le séquençage partiel initial de l'ADNr 16S révélait alors que ces isolats formaient un groupe au statut taxonomique inconnu.

Avec les découvertes de Sy et al. (2001a et b), il devenait évident que ces souches pigmentées isolées de *Lotononis* étaient en relation étroite avec les bactéries du genre *Methylobacterium* isolées de crotalaires, montrant de plus, une forte homologie avec *M. nodulans*. Par ailleurs, les plantes du genre *Lotononis* sont botaniquement proches de celles du genre *Crotalaria*. Ces deux genres appartiennent à la même tribu, les *Crotalariae*, au sein de la sous-famille des *Papilionoideae* (Polhill & Raven, 1981). Enfin, l'appartenance de ces souches au genre *Methylobacterium* a été confirmée par les travaux de Jaftha et al. (2002) (Fig.16) puis complétée par ceux de Yates et al. (2007).

III.4. Conclusions

Comme pour les rhizobia, le cas de l'association *M. nodulans* ou *Methylobacterium* sp. avec certaines Légumineuses de la tribu des *Crotalariae* est une symbiose au sens complet du terme, c'est-à-dire avec des échanges moléculaires de médiateurs chimiques engendrant le développement d'un nouvel organe végétal, le nodule, et la mise en place d'une nouvelle fonction métabolique, la fixation de l'azote.

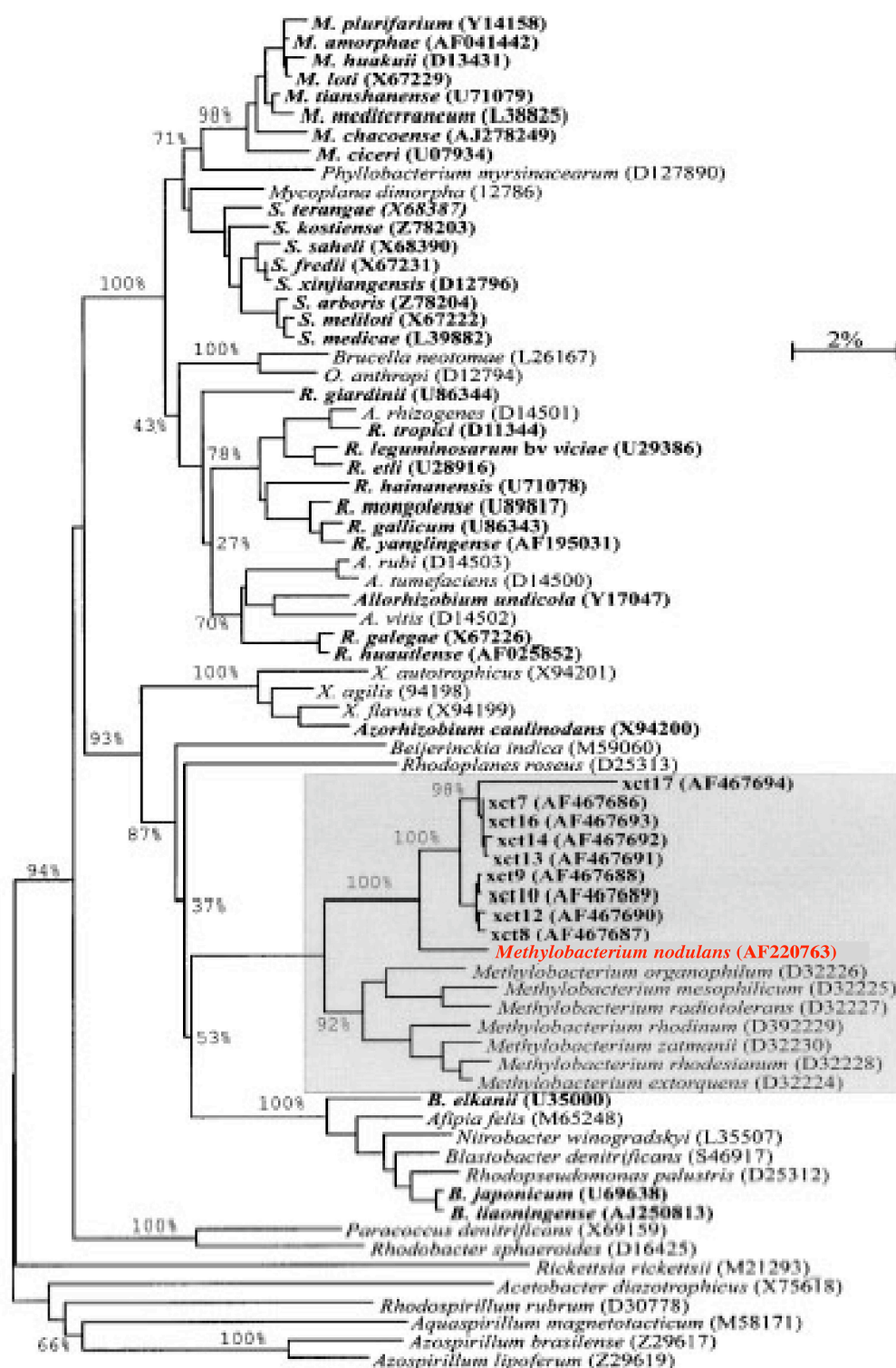


Figure 16. Relations phylogénétiques d'isolats nodulant de *Lotononis bainesii* en comparaison avec d'autres rhizobia et d'autres α -protéobactéries.

Cette analyse est basée sur la comparaison de séquences de fragments d'environ 1200 pb de l'ADNr 16S. L'arbre a été construit en utilisant la méthode de Neighbour-joining de Saitou et Nei (1987). Les numéros d'accèsion GenBank sont indiqués entre parenthèses, les bactéries nodulantes en gras.

Abréviations : A : *Agrobacterium*, B : *Bradyrhizobium*, M : *Mesorhizobium*, O : *Ochrobactrum*, R : *Rhizobium*, S : *Sinorhizobium*, X : *Xanthobacter*.

Issue de Jaftha et al. (2002).

La spécificité de l'association symbiotique fixatrice d'azote *Methylobacterium*-Légumineuses peut résulter d'une adaptation de la bactérie à son milieu. En effet, les *Crotalaria* comme les *Lotononis* sont des plantes productrices d'alcaloïdes de type pyrrolizidinique que les *Methylobacterium* pourraient métaboliser et utiliser dans la synthèse de certains de leurs composés. Cette association peut être aussi le résultat d'une évolution de certaines espèces de *Methylobacterium* qui auraient acquis les gènes de nodulation (gènes nod) ainsi que les gènes de la fixation de l'azote (*nifH*) par transfert latéral de gènes. Dans ce cas, la spécificité de symbiose pourrait également reposer sur la nature des messages moléculaires échangés entre la plante (les flavonoïdes) et la bactérie (les facteurs Nod) comme cela est décrit lors de l'établissement de la relation symbiotique classique rhizobia – Légumineuses.

CHAPITRE I

LES PROPRIÉTÉS MÉTHYLOTROPHIQUES DU PARTENAIRE BACTÉRIEN ET CES CONSÉQUENCES SUR LA PLANTE-HÔTE

I. Rôle de la méthylotrophie durant la symbiose entre *Methylobacterium nodulans* et *Crotalaria podocarpa*

I.1. Introduction

La fonction méthylotrophique est considérée comme un exemple original parmi les capacités métaboliques remarquables dont sont dotés certains microorganismes : les bactéries méthylotrophes sont capables de croître et de se développer en utilisant comme seules sources de carbone, des composés mono-carbonés fortement réduits (méthanol, formate, formaldéhyde et méthylamine) généralement délaissés par la majorité des autres organismes (Chistoserdova et *al.*, 2003).

Aujourd'hui, grâce au séquençage du génome complet des principaux modèles bactériens méthylotrophes, *Methylobacterium extorquens* et *Methylococcus capsulatus*, l'organisation des voies métaboliques de la fonction méthylotrophique ainsi que le rôle des gènes associés permettent d'établir un schéma presque complet de fonctionnement de la méthylotrophie. Sur la figure 14, les 3 modules sont clairement identifiés : le module 1 correspond à l'oxydation primaire des composés C₁ en formaldéhyde ; le module 2 comprend les étapes de transfert du formaldéhyde vers les autres voies métaboliques ; le module 3 regroupe les cycles d'assimilation du formaldéhyde ou d'oxydation complète fournissant de l'énergie, permettant à la bactérie d'adapter son métabolisme en fonction de ses besoins (Chistoserdova et *al.*, 2003).

Néanmoins, l'état d'avancement des connaissances biochimiques et génétiques n'apporte pas d'information majeure nouvelle sur le rôle de la présence d'une telle fonction métabolique dans la relation plantes – *Methylobacterium*. L'hypothèse la plus probable et actuellement admise serait que la fonction méthylotrophique développée par les *Methylobacterium* permettrait de diminuer la quantité locale de méthanol accumulé lors de la déméthylation des pectines méthylées constitutives des parois cellulaires végétales (Holland, 1997 ; Lidstrom & Chistoserdova, 2002). Il faut en effet rappeler que le méthanol, substrat mono-carboné utilisé par les bactéries méthylotrophes, est un des premiers sous-produits naturels de la décomposition des pectines méthylées, polysaccharide constitutif des organes et des tissus végétaux (Prade et *al.*, 1999). Le méthanol est produit notamment lorsque la plante subit un stress entraînant la dégradation de certains de ses tissus dont les ciments pectiques

intercellulaires. Les *Methylobacterium* contribueraient ainsi à une détoxification des plantes, utilisant le méthanol pour se développer et en échange produiraient des cytokinines activant la croissance de la plante par la régénération de ses tissus (Holland, 1997; Lidstrom & Chistoserdova, 2002).

La découverte de souches bactériennes appartenant au genre *Methylobacterium* et isolées à partir de nodules de légumineuses (Sy et al., 2001b ; Jaftha et al., 2002) ainsi que le caractère spécifique de cette association (Sy et al., 2001a), nous ont amené à analyser le lien qu'il serait possible d'établir entre la propriété métabolique méthylothropique de ces bactéries et leur capacité symbiotique fixatrice d'azote. Pour cela, nous avons choisi d'étudier en premier lieu l'expression du gène *mxoF*, principal gène marqueur caractérisant la fonction méthylothropique. Plus précisément, nous avons mesuré l'induction du promoteur du gène *mxoF* de la souche type de *M. nodulans*, ORS 2060, dans les nodules de sa plante hôte, *C. podocarpa*. En second lieu, nous avons réalisé la perte de la fonction méthylothropique par mutations dans le locus *mxo*, notamment dans le gène *mxoF* et son promoteur, et nous avons observé les conséquences de ces mutations sur les capacités de la bactérie à noduler et à fixer l'azote chez *C. podocarpa*.

I.2. Article 1: "Role of methylophony during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*".

Ce travail de thèse faisant suite aux travaux de Philippe Jourand (Jourand, 2003 ; Jourand et al., 2004a) sur *M. nodulans*, j'ai participé pour cet article aux points suivants :

- élaboration des mutants complémentés,
- expérimentation sur plante (mise en place, inoculation des plantes, suivi de la croissance, récoltes des matériels biologiques, analyses des résultats et interprétation statistique),
- histologie et histolocalisation,
- tests complémentaires de biochimie tel que le dosage du méthanol dans les nodules,
- contribution à la rédaction.

Role of Methyлотrophy During Symbiosis Between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*

Philippe Jourand,¹ Adeline Renier,¹ Sylvie Rapior,² Sergio Miana de Faria,¹ Yves Prin,¹ Antoine Galiana,¹ Eric Giraud,¹ and Bernard Dreyfus¹

¹Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 AgroM/CIRAD/INRA/IRD/UMI, TA 10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France; ²Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 CEFE, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

Submitted 11 April 2005. Accepted 14 June 2005.

Some rare leguminous plants of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by the methyлотrophic bacterium *Methylobacterium nodulans*. In this study, the expression and role of bacterial methyлотrophy were investigated during symbiosis between *M. nodulans*, strain ORS 2060^T, and its host legume, *Crotalaria podocarpa*. Using *lacZ* fusion to the *mxoF* gene, we showed that the methyлотroph genes are expressed in the root nodules, suggesting methyлотrophic activity during symbiosis. In addition, loss of the bacterial methyлотrophic function significantly affected plant development. Indeed, inoculation of *M. nodulans* nonmethyлотroph mutants in *C. podocarpa* decreased the total root nodule number per plant up to 60%, decreased the whole-plant nitrogen fixation capacity up to 42%, and reduced the total dry plant biomass up to 46% compared with the wild-type strain. In contrast, inoculation of the legume *C. podocarpa* with nonmethyлотrophic mutants complemented with functional *mxo* genes restored the symbiotic wild phenotype. These results demonstrate the key role of methyлотrophy during symbiosis between *M. nodulans* and *C. podocarpa*.

Additional keyword: methanol.

The bacterial genus *Methylobacterium* belongs to the α subclass of the family *Proteobacteria*. It constitutes a group of strictly aerobic, gram-negative, rod-shaped, pink-pigmented facultative methyлотrophic (PPFM) bacteria (Green 1992). Presently, the genus comprises 19 species isolated from a wide range of environments (Doronina et al. 2002; Gallego et al. 2005a, in press; Green 1992; Jourand et al. 2004; Van Aken et al. 2004).

The main feature of members of *Methylobacterium* is their ability to oxidize methanol, a methyлотrophic property based on the presence of methanol dehydrogenase (MDH), a pyrrolo-quinoline quinone (PQQ)-linked protein with an $\alpha_2\beta_2$ tetramer structure (Anthony 1982; Anthony et al. 1994). The genes enabling methanol oxidation have been studied in the model strain *Methylobacterium extorquens* AM1 (Chistoserdova et al.

2003). The main gene cluster, containing 14 genes named *mxoFJGIRSACKLDEHB*, is transcribed in a single mRNA operon. Transcription is controlled by a methanol inducible promoter (Zhang and Lidstrom 2003). Within the gene cluster, *mxoF* and *mxoA* genes encode the largest α and the smallest β polypeptide subunits of MDH, respectively (Anderson et al. 1990; Nunn et al. 1989; Nunn and Lidstrom 1986a and b).

Although most *Methylobacterium* spp. have been regularly isolated from soils, water, or plants (Corpe and Rheem 1989; Gallego et al. 2005a; Green 1992; Holland 1997), little is known about the role of the methyлотrophic function in the adaptation of bacteria to these various ecosystems. Only a few studies have suggested that *Methylobacterium* spp. were able to use methanol emitted by leaf stomata during their association with plants (Lidstrom and Chistoserdova 2003; Nemeček-Marshall et al. 1995).

Over the last 5 years, *Methylobacterium* spp. strains have been isolated from root nodules of legumes belonging to the genera *Crotalaria* and *Lotononis* (*Fabaceae* and *Crotalariae*) (Jaftha et al. 2002; Samba et al. 1999; Sy et al. 2001a and b). Nonpigmented strains isolated from three *Crotalaria* spp. (i.e. *Crotalaria glaucoides*, *C. perrottetii*, and *C. podocarpa*) were described as actually being a single novel *Methylobacterium* sp. (Sy et al. 2001a and b). This new species, which has the same methyлотrophic function as other *Methylobacterium* spp., was named *M. nodulans* for its ability to nodulate and fix nitrogen specifically during symbiosis with *Crotalaria* spp. (Jourand et al. 2004; Sy et al. 2001a and b).

The aim of this work was to study the relationship between the methyлотrophic function of *M. nodulans* during symbiotic processes with the host legume, *C. podocarpa*. The expression of methyлотroph genes during symbiosis was investigated using *lacZ* fusion to *mxoF*, whereas the role of methyлотrophy was determined by studying the effect of methyлотroph mutants on the plant growth.

RESULTS

Methyлотrophy of *M. nodulans* is expressed in root nodules formed during symbiosis with *Crotalaria podocarpa*.

To monitor the expression of methyлотroph genes in planta, we constructed a *M. nodulans* ORS 2060^T recombinant strain bearing a *mxoF-lacZ* transcriptional fusion promoter (Fig. 1A).

The *mxoF-lacZ* fusion promoter was pretested in vitro by measuring the β -galactosidase (β -gal) activity of the wild-type

Corresponding author: P. Jourand; Telephone: (33) 4 67 59 38 24; Fax: (33) 4 67 59 38 02; E-mail: jourand@mpl.ird.fr

Permanent address for Sergio Miana de Faria: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, km47 antiga estrada Rio-Sao-Paulo, Seropédica, 23851-970 RJ, Brazil.

strain or the recombinant strain after culture in yeast extract-mannitol (YM) medium supplemented or not supplemented with methanol. β -Gal activity was detected only in cultures of the *M. nodulans* recombinant strain 2060 *mxoF-lacZ* (Table 1). Moreover, in the presence of methanol, its level was 20-fold higher than the basal activity detected in the control, thus confirming that methanol induces *mxoF* gene expression in *M. nodulans*. Such an *mxoF* induction by methanol previously was described in the two *Methylobacterium* model species, *M. extorquens* and *M. organophilum*, with induction levels ranging from 8- to 10-fold (Xu et al. 1993; Zhang and Lidstrom 2003).

Expression of the *mxoF-lacZ* fusion promoter therefore was tested in planta by the histochemical localization of β -gal in nodule tissues. The β -Gal activity (Fig. 2A and A', in blue) was detected in *C. podocarpa* root nodules inoculated with the *M. nodulans* recombinant strain 2060 *mxoF-lacZ*. Enzymatic activity clearly was localized in the apex of the nodule, as shown in thin longitudinal sections from fresh nodules (Fig. 2A). The blue-colored apex zone corresponding to β -gal activity also was viewed in half-nodule sections (Fig. 2A'). Interestingly, it appears that the apex zone was distinct from the medullar nitrogen-fixing zone, which is red-colored due to the

presence of leghemoglobin (Balestrasse et al. 2004). In contrast, no β -gal activity was detected in nodules formed after inoculation with the *M. nodulans* wild-type strain (Fig. 2B and 2B').

These results clearly showed that the *mxoF* gene of *M. nodulans* was expressed in root nodules during symbiosis and preferentially localized at the nodule apex. In vitro assays indicated that the *mxoF* gene of *M. nodulans* is inducible by methanol; therefore, its expression, observed in planta, could result from the presence of methanol produced during nodule development. To test this hypothesis, we measured residual

Table 1. β -Galactosidase (β -gal) total activity expressed in μ mol of *o*-nitrophenyl- β D-galactoside (ONPG)/min/mg of total protein^a

Strain	Control	Methanol
ORS 2060 ^T wild type	ND	ND
ORS 2060 <i>mxoF-LacZ</i>	0.15 \pm 0.02 a	3.5 \pm 0.08 b

^a Both β -gal activity and total proteins were investigated on cell extracts prepared from *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T wild type or recombinant *M. nodulans* ORS 2060^T *mxoF-LacZ*. ND = not detected. All data followed with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

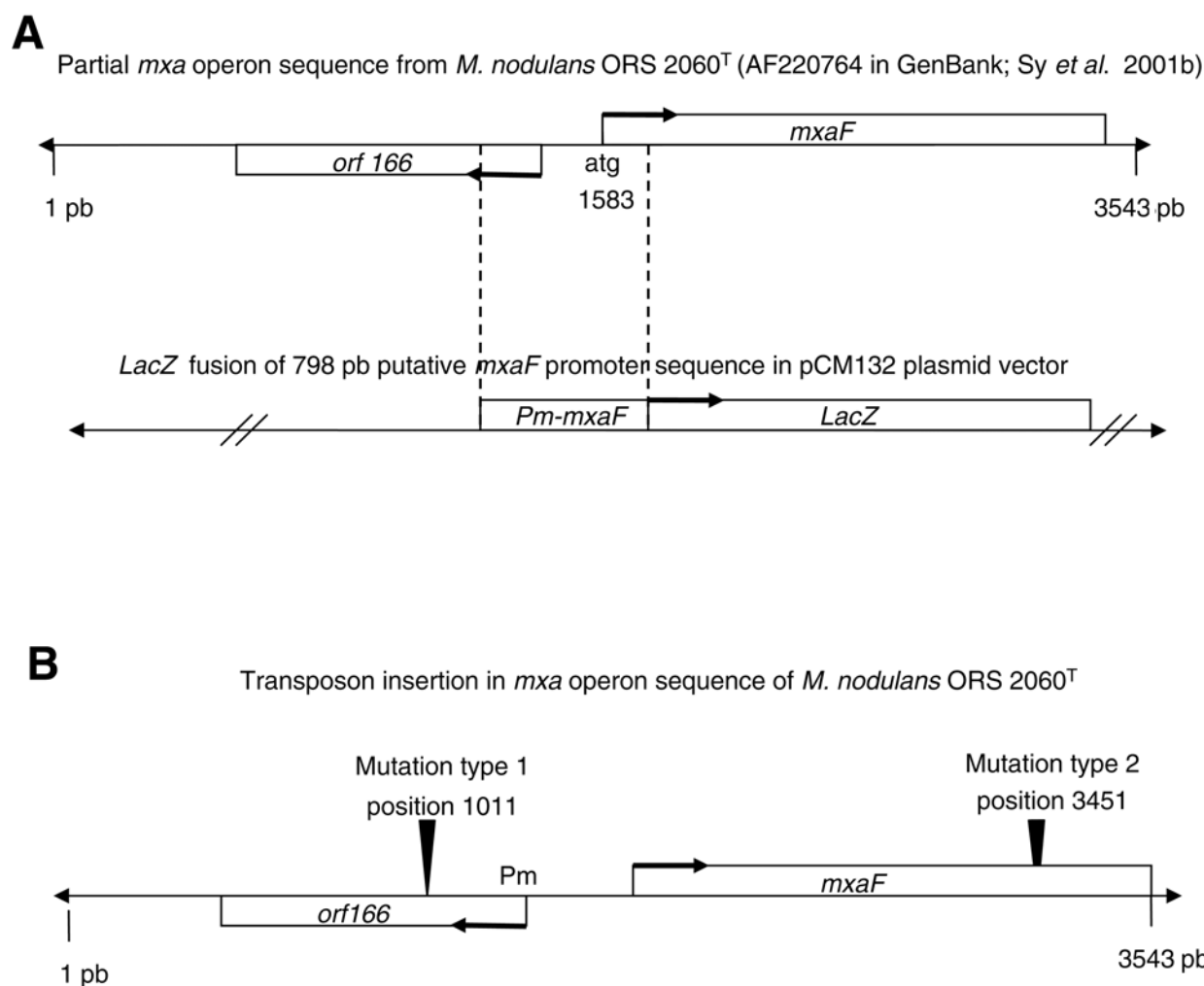


Fig. 1. Construction of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T recombinant strain containing *mxoF-LacZ* transcriptional fusion promoter and ORS 2060^T negative methylopath mutants by insertional mutagenesis of transposon *mTn5-GGm*. **A**, Physical map of the partial sequence of the operon *mxo* in *M. nodulans* ORS 2060^T wild type (AF 220764 in GenBank) according to Sy and associates (2001a), including the deduced *mxoF* putative promoter sequence position compared with the *M. extorquens* AM1 *mxoF* promoter sequence position as described by Zhang and Lidstrom (2003) and cloned into pCM132 plasmid vector (AF 327720 in GenBank) with *LacZ* gene reporter (Marx and Lidstrom 2001). Abbreviations: Pm: promoter; Bp: DNA pair of base spacing. **B**, Mutations of *mxo* locus sequence of *M. nodulans* ORS 2060^T by insertion of transposon *mTn5-GGm* (AF080392) (Reeve et al. 1999): mutation type 1 upstream of the putative *mxoF* promoter sequence and mutation type 2 inside the *mxoF* gene.

methanol levels in nodules as well as in roots, leaves, and stems. We found low concentrations of residual methanol in *C. podocarpa* tissues which were two- to fivefold higher in nodules than in roots, leaves, or stems (data not shown), indicating that methanol is more specifically accumulated in root nodules.

Loss of methylotrophy strongly affects symbiosis.

Negative methylotrophic mutants of *M. nodulans* were constructed to further investigate the role of bacterial methylotrophy in the symbiotic processes. These mutants were obtained by insertional mutagenesis of the *mTn5-GGm* transposon (Reeve et al. 1999). They were selected on allyl alcohol, as described by Nunn and Lidstrom (1986a and b). Two of them were selected according to the position of the transposon insertion sites (Fig. 1B). The first one (mutation type 1) was close to the *mx*a operon, approximately 500 bp upstream of the putative start codon of the *mx*aF gene. The second one (mutation type 2) was inside the *mx*aF gene. Defective methylotrophic metabolism of the two mutants was checked by

growth on M72 minimum mineral medium containing either sodium succinate or methanol as sole carbon source. Compared with the *M. nodulans* ORS 2060^T wild-type strain, both methylotrophic mutants presented normal growth on succinate but were unable to grow on methanol as sole carbon source (Fig. 3). In addition, MDH activity was tested according to Day and Anthony (1990): no MDH activity was detected in proteic extracts obtained from methylotrophic mutants, whereas this enzymatic activity is strongly detected in the wild-type strain protein extracts (data not shown). Two mutants were complemented with a conjugative cosmid containing a 35-kb DNA insert including the *mx*a operon of *M. nodulans* (Sy et al. 2001a). This complementation restored the methylotrophic capacity because the complemented mutants were able to grow on a M72 minimum mineral salt medium (MMS) with methanol as sole carbon source, and MDH activity also was detected (data not shown).

The growth of *C. podocarpa* plants inoculated with *M. nodulans* ORS 2060^T methylotrophic mutants type 1 or 2 was

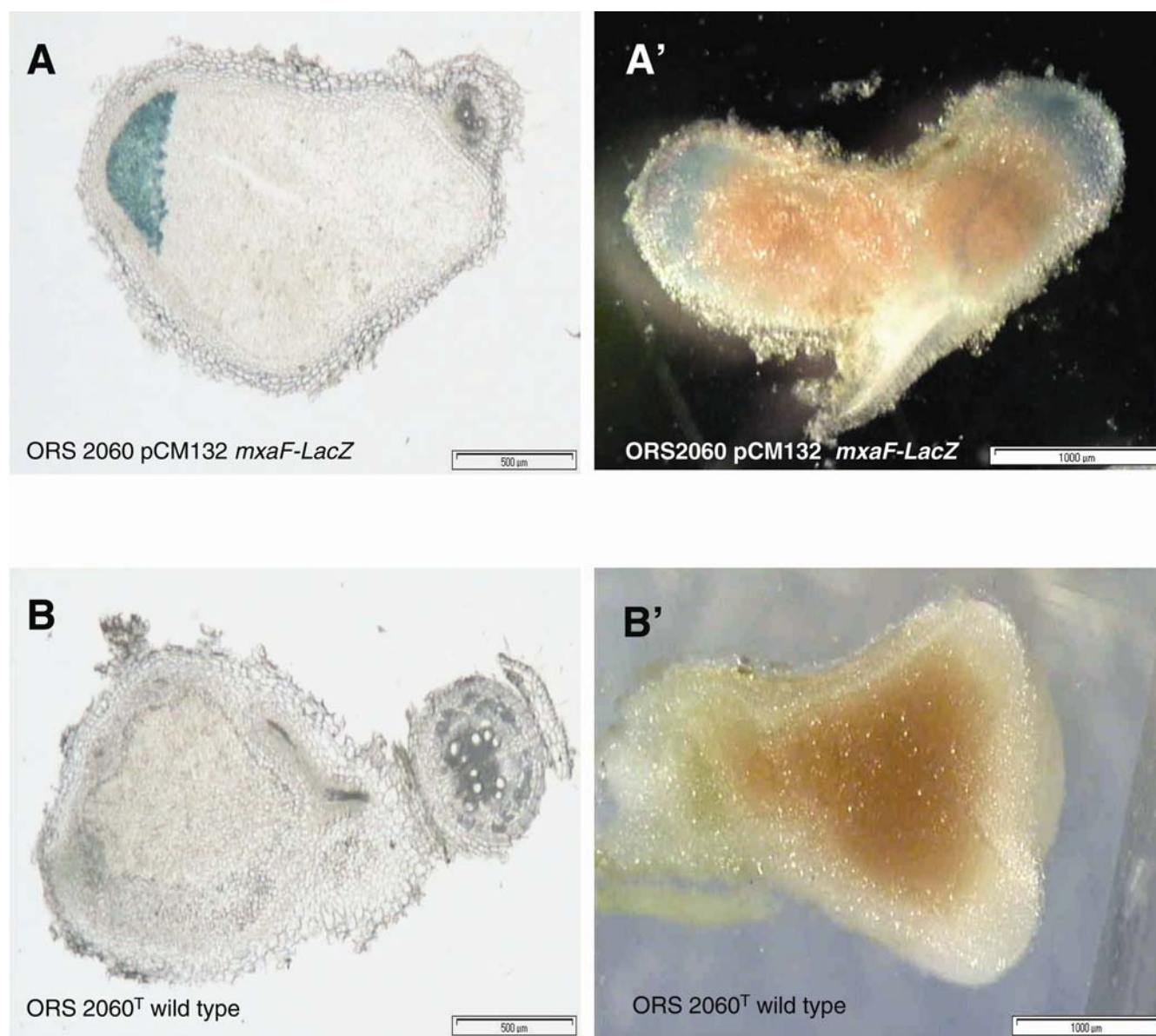


Fig. 2. A and A', Histochemical localization of the β -galactosidase activity in 6-week-old *Crotalaria podocarpa* root nodules induced by the *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T recombinant strain containing the *mx*aF-LacZ transcriptional fusion promoter compared with B and B', root nodules induced by *M. nodulans* ORS 2060^T wild type. A and B, Longitudinal nodule sections, 40 μ m thick; A' and B', longitudinal half of a *C. podocarpa* nodule with detection of leghemoglobin activity in red.

reduced substantially compared with that of plants inoculated with the wild-type strain (Fig. 4). This decrease in plant growth, which represented up to 46% biomass loss, was correlated with a drastic drop in the total root nodule number (up to 60%) and a significant reduction in the nitrogen fixation ability (up to 42%) (Table 2). Interestingly, if nodule number strongly decreased, the size of mutant nodules was bigger, leading to a nodule mass two to seven times higher than the wild type. In any case, for both mutants, nitrogen fixation per milligram of nodule appeared 1.2- to 5-fold weaker than the wild type (Table 2). We calculated that the average dry weight of nodules necessary to produce 100 g of plant biomass was two- to fivefold higher with the methylotrophic mutants than with the wild-type strain (Table 2). Altogether, these data indicate that the methylotrophic function of *M. nodulans* plays a major role during the symbiotic process between the bacteria and the legume. In contrast, inoculation of *C. podocarpa* with the complemented mutants restored the wild-type symbiotic phenotype (data not shown).

DISCUSSION

Although most *Crotalaria* spp. are nodulated by nonmethylotrophic *Bradyrhizobium* spp., only a few African species have the unusual ability to symbiotically and specifically associate with the newly described *M. nodulans* (Gao et al. 1994; Samba et al. 1999; You et al. 2002). Interestingly, another spe-

cific symbiosis with *Methylobacterium* spp. has been described in the genus *Lotononis*, which belongs to the same *Crotalariae* tribe (Jaftha et al. 2002). The symbiotic specificity observed between *Methylobacterium* spp. and some *Crotalariae* spp. raised the question as to the putative role of methylotrophy during this host–bacteria interaction. In this article, we clearly demonstrated that methylotrophy of *M. nodulans* is advantageous during symbiosis with the host legume *C. podocarpa*.

We first studied the expression of the *mxoF* gene, one of the key methylotrophic genes in *Methylobacterium* spp., both in vitro and in planta. We demonstrated that, in *M. nodulans*, this gene is not constitutively expressed but instead controlled by a methanol inducible promoter, as previously shown for *M. extorquens* and *M. organophilum* (Xu et al. 1993; Zhang and Lidstrom 2003). Close examination of the DNA sequence upstream of the putative start codon did not reveal any obvious DNA motif, which might be the target of a putative methanol-dependent regulator. This is in agreement with the previous study of Zhang and Lidstrom (2003), in which the promoter regions of four methanol-inducible operons were compared but no consensus sequence was observed. Therefore, the molecular basis of the control of *mxoF* operons in *Methylobacterium* spp. remains to be determined. Interestingly, the insertion of the Tn5 transposon 572 bp upstream of the putative *mxoF* start codon led to a negative methylotrophic metabolism. The *mxoW* gene was not detected in this region, as also was observed in *M. extorquens* (Springer et al. 1998; Zhang and Lidstrom 2003). Instead, this region was found to contain a putative open reading frame (ORF) encoding a protein of 163 amino acids, which did not display homology with any known proteins. The phenotype of this mutant may result from i) inactivation of this putative ORF, which could play a role in methylotrophy or ii) insertion of the Tn5 in the *mxoF* promoter region, which would extend more than 600 bp upstream of the *mxoF* putative start codon.

In planta, we observed that the *mxoF* gene was expressed in root nodules. In accordance with the in vitro study, this observation suggests that methanol is present inside the nodule and subsequently used by the bacteria. In agreement, a substantial amount of methanol was detected in the nodule tissue. In plants, methanol can be produced from different sources, such as protein repair pathways, lignin degradation, and cell-wall pectin demethylation (Downie et al. 2004). During symbiosis between *M. nodulans* and *Crotalaria* spp., we hypothesize that methanol could be produced from pectin cell-wall de-methylation. In agreement, we observed that the nodule apical tissue (i.e., the zone where the *mxoF* gene was expressed) was highly disorganized (data not shown). This could have resulted from either plant or bacteria pectinase production. Note that plants are known to produce several classes of pectinases (Prade et al. 1999), whereas there has not been any previous evidence that *Methylobacterium* spp. can degrade pectin. Further cytological observations and studies about pectin metabolism by *M. nodulans* might highlight the role of pectinolytic enzymes and interactions with bacterial methylotrophy during symbiosis between *M. nodulans* and *Crotalaria* spp.

The study of the plant response to inoculation with negative methylotrophic mutants highlighted the role of methylotrophy during symbiosis. Indeed, the absence of methylotrophy significantly affected *C. podocarpa* plant growth by up to 42%. This decrease of plant biomass was associated with a drastic reduction in total number of nodules and a drop in nitrogen fixation efficiency. The differences in nodule dry weight observed between the two mutants phenotypes could result from the different Tn5 insertions. Indeed, in mutant 1, the Tn5 insertion, located in the putative promoter region of *mxoF*, therefore could only partially affect the in planta methylotrophy

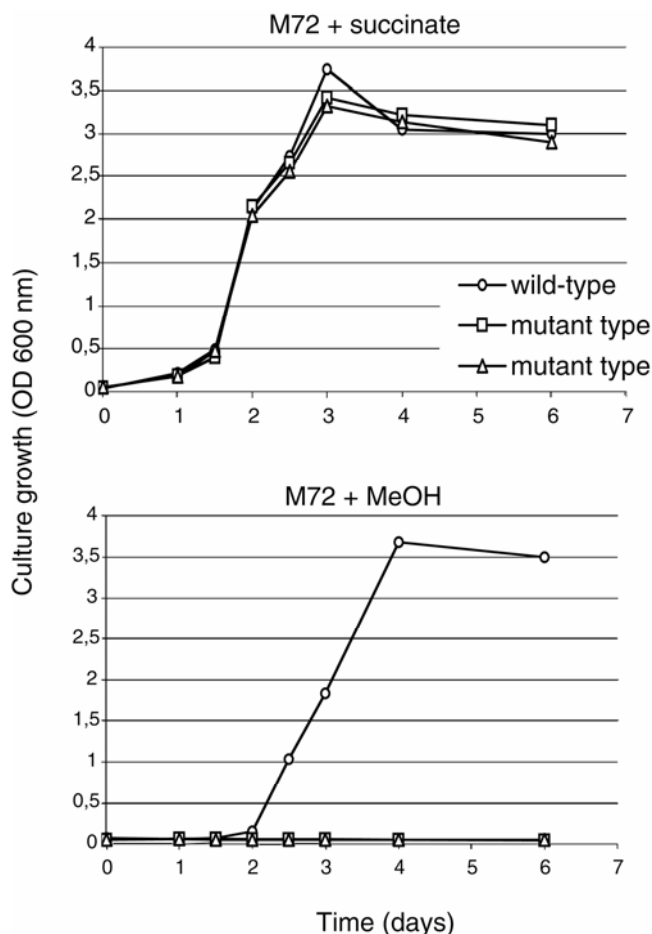


Fig. 3. Growth of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T strains pregrown in succinate, harvested, and resuspended in minimum mineral medium containing either sodium succinate or methanol. Strains examined were methylotroph mutants *mTn5-GGm-pmmxof* (mutation type 1) and *mTn5-GGm-mxof* (mutation type 2) compared with the wild-type.

compared with mutant 2. This suggests that methylotrophy might be implicated at different levels of symbiosis.

During the first steps of infection, methylotrophy could be involved in the bacterial ability to colonize or invade plant roots. Indeed, some species of the *Crotalariae* tribe, including *C. podocarpa*, are reported to produce toxic methylated compounds such as pyrrolizidin alkaloids (Kingham and Smolenski 1981; Wink and Mohamed 2003). Based on their methylotrophy capacity, *Methylobacterium* spp. might be able to detoxify these toxic molecules. Thus, the symbiotic specificity observed between *Methylobacterium* and *Crotalariae* spp. could result from bacterial plant selection based on the rhizospheric excretion of these toxic molecules. Such plant selection already has been reported for *Rhizobium* strains resistant to mimosine in rhizospheres of *Leucaena leucocephala* (Soedarjo et al. 1994) and maybe also for *R. etli* in maize (Rosenblueth and Martinez-Romero 2004).

Methylotrophy is a bacterial metabolic pathway used to assimilate carbon or retrieve energy (Chistoserdova et al. 2003). Therefore, during symbiosis, we could hypothesize that this function contributes to carbon or energy sources for the bacteria. Indeed, the bacteria could be able to recycle methanol produced through tissue degradation during nodule develop-

ment and senescence, thus saving energy that the plant has to furnish to the bacteria for nitrogen fixation. In agreement, the marked drop in acetylene reduction activity observed with the methylotrophic mutants could reflect a decrease of energy supply to nitrogenase.

Methanol is known to be a key one-carbon signal metabolite regulating the expression of numerous genes involved in cell division, communication, metabolism, and defence of plants (Downie et al. 2004). Therefore, we cannot completely dismiss the possibility that bacterial methylotrophy interferes in nodule cell-wall rearrangements or defence mechanisms by suppressing the methanol signal.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions.

M. nodulans strains were i) ORS 2060^T (Jourand et al. 2004), called the wild-type strain throughout this study, ii) the constructed recombinant strain ORS 2060 *mxnF-lacZ*, and iii) the methylotrophic mutants ORS 2060 *mTn5-GGm-mxnF* (mutation type 1) and ORS 2060 *mTn5-GGm-mxnF* (mutation type 2). All *M. nodulans* strains were grown in YM medium (Vincent 1970) for preparation of plant inoculum and in M72

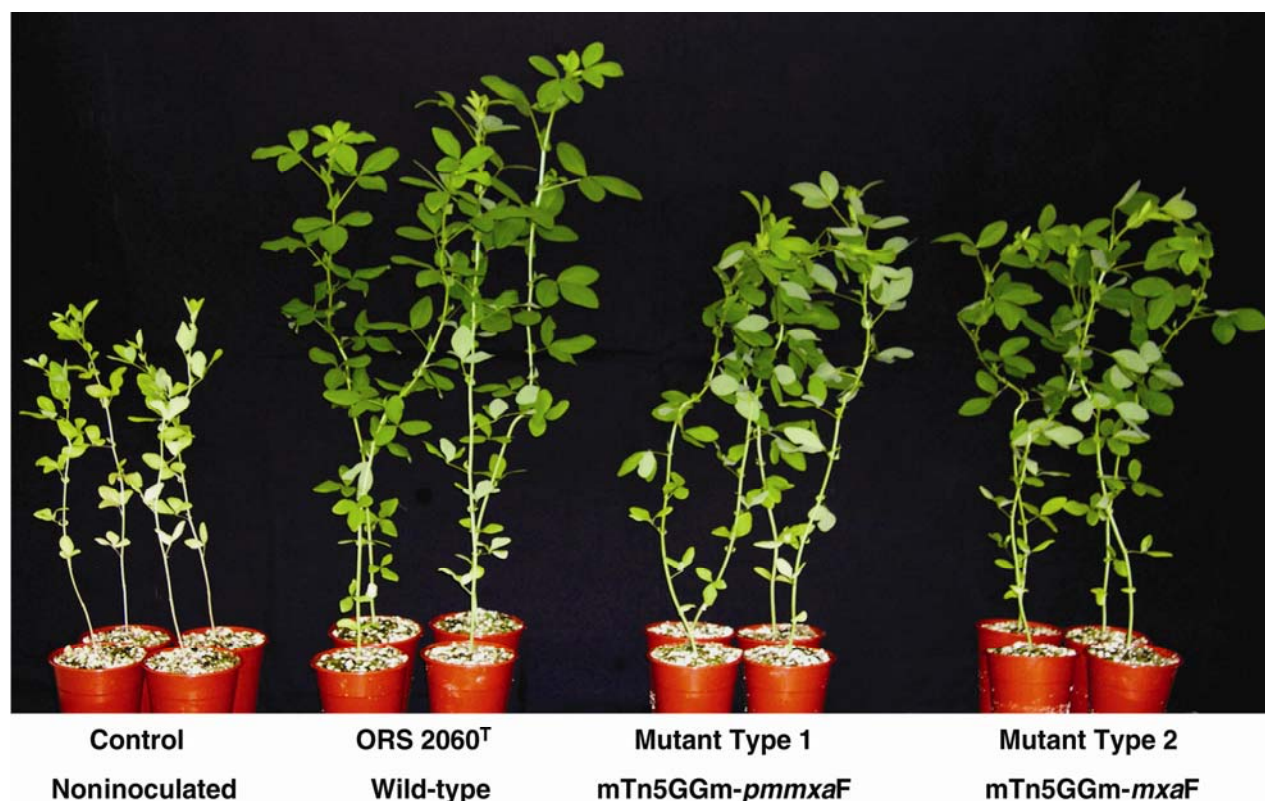


Fig. 4. Comparison of growth of *Crotalaria podocarpa* inoculated with either *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T wild type or ORS 2060^T negative methylotroph mutants compared with noninoculated control. Photographs were taken 5 weeks after inoculation.

Table 2. Symbiotic phenotypes of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T wild-type and negative methylotrophic mutants on *Crotalaria podocarpa*^z

Strain	Plant dry wt (g/plant)	No. of nodules/plant	Average nodule dry wt (mg)	Acetylene reduction (C ₂ H ₄ μ mol/h/plant)	Acetylene reduction/mg of nodule/plant	Average nodule dry wt (g) to produce 100 g of plant
ORS 2060 ^T wild type	2.8 \pm 0.2 a	30 \pm 11 a	5.6 \pm 0.7 a	11.4 \pm 0.2 a	0.067 \pm 0.002 a	6.0 \pm 0.6 a
ORS 2060 ^T <i>mTn5GGm-mxn</i>						
Mutation type 1	1.5 \pm 0.1 b	12 \pm 4 b	13 \pm 2 b	8.6 \pm 0.3 b	0.055 \pm 0.001 b	10.4 \pm 0.8 b
Mutation type 2)	1.6 \pm 0.2 b	13 \pm 5 b	38 \pm 4 c	6.6 \pm 0.2 b	0.013 \pm 0.001 c	30.7 \pm 0.8 c
No inoculum (control)	0.2 \pm 0.03 c	0	0	0	0	0

^z Plant dry weight (dry wt) biomass, nodule number and dry wt, and nitrogen-fixing activity expressed by acetylene reduction assay were performed 5 weeks after inoculation. All data followed with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$)

minimum mineral medium (Green 1992) supplemented with either sodium succinate (10 mM) or methanol (50 mM) for both the methylotrophic tests and the in vitro total β -gal activity. *Escherichia coli* strains (i.e., pCM132, BW 20767 containing plasmid pCRS548 with mini-transposon *mTn5-GGm*, conjugative strain S17-1, and strain STM 217) were provided by M. E. Lidstrom (Marx and Lidstrom 2001), W. G. Reeve (Reeve et al. 1999), and R. Simon (Simon et al. 1983) and the strain collection of the Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (Montpellier, France) (Jourand et al. 2004; Sy et al. 2001a), respectively. Standard methods were used for growth of *E. coli* in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook et al. 1989). All media were supplemented with appropriate antibiotics: nalidixic acid (100 μ g/ml) for the three types of *M. nodulans* strains; kanamycin (50 μ g/ml) for *M. nodulans* ORS 2060^T *mxoF-lacZ* and *E. coli* pCM132; and gentamycin (30 μ g/ml) for *M. nodulans* methylotrophic mutants (type 1 and type 2) and *E. coli* BW 20767. Strains were grown aerobically, at 37°C under gyratory shaking (170 rpm) in complete darkness, for the appropriate time to obtain one unit of optical density (OD) at 600 nm.

General DNA technology.

Genomic DNA was prepared according to Chen and Kuo (1993). Plasmid and cosmid DNA were isolated with a Mini-prep kit (Promega, Charbonnières, France). Polymerase chain reaction (PCR) products were purified with a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Restriction endonuclease and ligase reactions were performed according to the manufacturer's specifications (Eurogentec, Angers, France). For DNA amplification, sequencing and analysis, the primers used are described in Table 3. All reactions for PCR or sequencing as well as the methods for DNA sequencing and analysis were carried out as previously described by Sy and associates (2001a).

Construction of the *M. nodulans* ORS 2060^T recombinant strain containing the *mxoF-LacZ* transcriptional fusion promoter.

From the total genomic DNA of *M. nodulans* ORS 2060^T wild type, a 798-bp DNA fragment was amplified with primers 1 and 2 (Table 3) corresponding to the DNA putative promoter section of the *M. nodulans* sequenced gene *mxoF* as described in Figure 1A (AF220764 sequence in GenBank) (Sy et al. 2001a). This 798-bp DNA fragment was cloned into the *EcoRI* and *BglII* sites of the pCM132 plasmid vector (Marx and Lidstrom 2001). The combined plasmid pCM132-*mxoF-lacZ* vector was transferred by electroporation (transformation) into conjugative *E. coli* S17-1 using an electroporator (Biorad, Ivry, France) and then transferred by conjugation into *M. nodulans* ORS 2060^T wild type. Conjugative colonies were selected on YM medium containing antibiotics (kanamycin at 50 μ g/ml and nalidixic acid at 100 μ g/ml). Recombined *M. nodulans* ORS 2060 *mxoF-lacZ*-positive clones were controlled for *lacZ* in vitro expression after promoter *mxoF* methanol induction in M72 minimum mineral medium supplemented with MeOH (50 mM) and the same two antibiotics mentioned above and then compared with the *M. nodulans* ORS 2060^T wild-type strain.

Construction

of *M. nodulans* ORS 2060^T methylotrophic mutants.

Insertional mutagenesis of the *M. nodulans* DNA *mxo* operon was carried out by insertion of the *mTn5-GGm* transposon using conjugation between the *M. nodulans* ORS 2060^T wild type and *E. coli* BW20767 containing the *mTn5-GGm*. After conjugation, conjugants first were selected on YM medium supplemented with antibiotics (nalidixic acid at 100 μ g/ml and gentamycin at 30 μ g/ml). Then, methylotroph mutants were selected by cultivating conjugants on microplates containing M72 minimum mineral medium with the same two antibiotics mentioned above, and i) sodium succinate (10 mM), ii) MeOH (50 mM), or iii) sodium succinate (10 mM), MeOH (50 mM), and allyl alcohol added to a final concentration at 0.2% (wt/vol) was used to select *Methylobacterium* methylotroph mutants as described by Nunn and Lidstrom (1986a). All chemicals were provided by Sigma-Aldrich (St-Quentin, France). Colonies growing on M72 + succinate and also on M72 + succinate + MeOH + allyl-alcohol but not growing on M72 + MeOH were selected as methylotroph-negative clones, which were controlled by PCR for the presence of *mTn5-GGm* transposon using primers 4 and 5 (Table 3). Among the positive *mTn5-GGm* clones, a new screening was carried out with PCR using primer pairs (Table 3) to identify the position of the insertional transposon mutagenesis in the *mxoF* promoter sequence and in the *mxoF* gene. Positions of *mTn5-GGm* (Fig. 1B) were obtained by DNA sequencing. Selected clones of *M. nodulans* ORS 2060 *mTn5-GGm-mxoF* (mutation type 1) and ORS 2060 *mTn5-GGm-mxoF* (mutation type 2) were grown on M72 + succinate or M72 + MeOH to verify the loss of the methylotrophy capacity by measuring bacterial growth with a UV-visible spectrophotometer at OD 600 nm (Varian, Courtaboeuf, France).

Complementation of methylotrophic mutants.

For complementation experiments, we used the STM217 clone of *E. coli* XL1-MR from the genomic library of the *M. nodulans* ORS 2060^T wild type as described by Sy et al. (2001a) and containing the 35-kb *mxoF* DNA fragment cloned into the cosmid SuperCosI (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.). After growth of the STM 217 clone on LB supplemented with kanamycin (50 μ g/ml), the cosmid was extracted using the DNA Miniprep Kit as described above and then transferred to the conjugative strain of *E. coli* S17-1 by electroporation. Transformed clones were selected on LB + kanamycin (50 μ g/ml). Then, the cosmid was transferred for complementation by conjugation between the transformed conjugative *E. coli* S17-1 and both *M. nodulans* methylotrophic mutants type 1 and type 2. Complemented *M. nodulans* methylotrophic mutants were selected on M72 minimum mineral medium containing nalidixic acid (100 μ g/ml) + gentamycin (30 μ g/ml) + kanamycin (50 μ g/ml) and MeOH (50 mM) as sole carbon source. Their symbiotic phenotypes were tested on *C. podocarpa* plants.

Plant tests.

C. podocarpa seeds were obtained from IRD (Bel-Air, Dakar, Senegal) and identified as reported by Jourand and associates (2004). Germination and cultivation of *C. podocarpa* were conducted in the greenhouse as previously described by

Table 3. Primers used for DNA amplification and sequencing

Name	Sequence	Target gene	Reference
pm <i>mxoF</i> 2060f	5'-GAA-TTC-CAG-AGG-ACA-AGA-GGT-TGA-TGT-TG-3'	Promoter <i>mxoF</i>	This study
pm <i>mxoF</i> 2060r	5'-ACA-GAT-CTC-TTA-CCC-AGC-ATG-TGC-GTC-TCC-CA-3'	Promoter <i>mxoF</i>	This study
WIL3	5'-GAA-TGC-CCA-CAG-GCC-CTG-GAG-3'	Transposon <i>mTn5-GGm</i>	Reeve et al. 1999
TAC-105F	5'-GCA-TCT-AGC-CCG-CCT-ATT-G-3'	Transposon <i>mTn5-GGm</i>	Reeve et al. 1999

Giraud and associates (2000) and Sy and associates (2001a). At day 15 after germination, plants were root inoculated with 5 ml of culture of either the *M. nodulans*, ORS 2060^T wild type, ORS 2060 *mxoF-lacZ*, ORS 2060 methylotrophic mutants, or ORS 2060 complemented methylotrophic mutants. Sterile distilled water was used for control. All the inocula were prepared according to Giraud and associates (2000). Fifteen replicates were grown for each experimental treatment. Six weeks after inoculation, plants were harvested. Nitrogen-fixing activity was estimated by measurement of acetylene-reducing activity on the entire plant according to Hardy and associates (1968). The dry plant biomass and the number and dry weight of root nodules were evaluated. All data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) and means were compared with the Newman-Keuls multiple range test ($P \leq 0.05$) using the Super ANOVA computer software package (Gagnon et al. 1989).

Enzyme assays, methanol dosage, and light microscopy.

Crude extracts of total soluble proteins were prepared by sonication, as reported by Day and Anthony (1990), from i) *M. nodulans* cultures ORS 2060^T wild type and ORS 2060^T pCM132 *mxoF-lacZ* grown in M72 mineral minimum medium with methanol (50 mM) or succinate (10 mM) supplemented with the appropriate antibiotics or ii) *C. podocarpa* nodule tissues. β -Gal activity was assayed in vitro using the standard method described by Miller (1972). MDH microassays were performed as described by Day and Anthony (1990). Total proteins were quantified using the Lowry method Biorad kit (Bio-rad, Ivry, France). Methanol dosage was performed as reported by Sy and associates (2001a). All data were subjected to a one-way ANOVA, and means were compared with the Newman-Keuls multiple range test ($P \leq 0.05$) as described above. In planta tests were performed on 40- μ m and whole half-thick sections of fresh nodules (VT1000S Vibratome, Leica, France), then stained for histo- β -gal assays as described by Boivin and associates (1990). After mounting in water, nodule sections were observed and photographed under light microscopy as reported by Sy and associates (2001a).

LITERATURE CITED

- Anderson, D. J., Morris, C. J., Nunn, D. N., Anthony, C., and Lidstrom, M. E. 1990. Nucleotide sequence of the *Methylobacterium extorquens* AM1 *mxoF* and *mxoJ* genes involved in methanol oxidation. *Gene* 90:173-176.
- Anthony, C. 1982. The Biochemistry of Methylotrophs. Academic Press, London.
- Anthony, C., Ghosh, M., and Blake, C. C. F. 1994. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrroloquinoline quinone. *Biochem. J.* 304:665-674.
- Balestrasse, K. B., Gallego, S. M., and Tomaro, M. L. 2004. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Soil* 262:373-381.
- Boivin, C., Camut, S., Malpica, C. A., Truchet, G., and Rosenberg, C. 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell* 2:1157-1170.
- Chen, W. P., and Kuo, T. T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21:2260.
- Chistoserdova, L., Chen, S., Lapidus, A., and Lidstrom, M. E. 2003. Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J. Bacteriol.* 185:2980-2987.
- Corpe, W. A., and Rheem, S. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 62:243-50.
- Day, D. J., and Anthony, C. 1990. Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. Pages 298-303 in: *Hydrocarbons and Methylotrophy. Methods in Enzymology*, vol 188. Academic Press Inc., San Diego, CA, U.S.A.
- Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A., Kuznetsov, B. B., Tourova, T. P., and Salkinoja-Salonen, M. S. 2002. *Methylobacterium suomiense* sp. nov. and *Methylobacterium lusitanum* sp. nov., aerobic, pink pigmented, facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:773-776.
- Downie, A., Miyazaki, S., Bohnert, H., John, P., Coleman, J., Parry, M., and Haslam, R. 2004. Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochemistry* 65:2305-2316.
- Gao, J. L., Sun, G., Li, Y., Wang, E. T., and Chen, W. X. 1994. Numerical Taxonomy and DNA relatedness of tropical Rhizobia isolated from Hainan Province, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:151-158.
- Gagnon, J., Roth, J. M., Haycock, K. A., and Finzer, W. 1989. Super-ANOVA. Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, U.S.A.
- Gallego, V., García, M. T., and Ventosa, A. 2005a. *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:281-287.
- Gallego, V., García, M. T., and Ventosa, A. 2005b. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from an aquatic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1415-1427.
- Giraud, E., Hannibal, H., Fardoux, J., Vermeglio, A., and Dreyfus, B. 2000. Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:14795-14800.
- Green, P. N. 1992. The genus *Methylobacterium*. Pages 2342-2349 in: *The Prokaryotes*, 2nd ed., vol III. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer, eds. Springer-Verlag, New York.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., and Burns, R. C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- Holland, M. A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent Res. Dev. Plant Physiol.* 1:207-213.
- Jaftha, J. B., Strijdom, B. W., and Steyn, P. L. 2002. Characterisation of pigmented Methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:440-449.
- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., and De Lajudie, P. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2269-2273.
- Kinghorn, A. D., and Smolenski, S. J. 1981. Alkaloids of *Papilionoideae*. Pages 585-589 in: *Advances in Legume Systematics*, Part 2. R. M. Polhill and P. H. Raven, eds. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Lidstrom, M. E., and Chistoserdova, L. 2003. Plants in the pink: Cytokinin production by *Methylobacterium*. *J. Bacteriol.* 184:1818.
- Marx, J. C., and Lidstrom, M. E. 2001. Development of improved versatile broad-host-range vectors for uses in methylotrophs and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 147:2065-2075.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Nemeček-Marshall, M., MacDonald, R. C., Franzen, J. J., Wojciechowski, C. L., and Fall, R. 1995. Methanol emission from leaves: Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiol.* 108:1359-1368.
- Nunn, D. N., Day, D., and Anthony, C. 1989. The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochem. J.* 260:857-862.
- Nunn, D. N., and Lidstrom, M. E. 1986a. Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase structural gene of *Methylobacterium* sp strain AM1. *J. Bacteriol.* 166:581-590.
- Nunn, D. N., and Lidstrom, M. E. 1986b. Phenotypic characterization of 10 methanol oxidation mutants' classes in *Methylobacterium extorquens* sp. strain AM1. *J. Bacteriol.* 166:591-597.
- Prade, R. A., Zhan, D., Ayoubi, P., and Mort, A. J. 1999. Pectins, pectinases, and plant-microbe interactions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16:361-391.
- Reeve, W. G., Tiwari, P. R., Worsley, P. S., Dilworth, M. J., Glenn, A. R., and Howieson, J. G. 1999. Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. *Microbiology* 145:1307-1316.
- Rosenbluth, M., and Martinez-Romero, E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181:337-344.
- Samba, R. T., De Lajudie, P., Gillis, M., Neyra, M., Spencer-Baretto, M. M., and Dreyfus, B. 1999. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. *Symbiosis* 27:259-268.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Simon, R., Prier, U., and Puhler, A. 1983. A broad host mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-790.
- Soedarjo, M., Hemscheidt, T. K., and Borthakur, D. 1994. Mimosine, a

- toxin present in leguminous trees (*Leucaena* spp.), induces a mimosine-degrading enzyme activity in some *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 60:4268-4272.
- Springer, A. L., Auman, A. J., and Lidstrom M. E. 1998. Sequence and characterization of *mxkB*, a response regulator involved in regulation of methanol oxidation, and of *mxw*, a methanol-regulated gene in *Methylobacterium extorquens* AM1. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 160:119-124.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Masson-Boivin, C., and Dreyfus, B. 2001a. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J. Bacteriol. 183:214-220.
- Sy, A., Giraud, E., Samba, R., De Lajudie, P., Gillis, M., and Dreyfus, B. 2001b. Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. Can. J. Microbiol. 47:503-508.
- Van Aken, B., Peres, C. M., Lafferty Doty, S., Yoon, J. M., and Schnoor, J. L. 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides nigra* DN34). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1191-1196.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.
- Wink, M., and Mohamed, G. I. A. 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: Mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of *rbcL* gene. Biochem. System. Ecol. 31:897-917.
- Xu, H. H., Viebahn, M., and Hanson, R. S. 1993. Identification of methanol-regulated promoter sequences from the facultative methylotrophic bacterium *Methylobacterium organophilum*. J. Gen. Microbiol. 139:743-752.
- You, Z., Marutani, M., and Borthakur, D. 2002. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. J. Appl. Microbiol. 93:577-584.
- Zhang, M., and Lidstrom, M. E. 2003. Promoters and transcripts for genes involved in methanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1. Microbiology 149:1033-1040.

II. Compléments d'études

Remarque : toutes les planches photographiques citées sont situées en fin de chapitre et une icône de rappel est insérée dans le texte.

II.1. Expression de la méthylothrophie dans les nodules

Pour suivre l'expression des gènes de la méthylothrophie *in planta*, une souche recombinée *M. nodulans* ORS 2060 portant une fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *LacZ* dans le promoteur du gène *mxoF* a été construite (cf article 1 : « Matériel et Méthodes »). L'expression du gène *mxoF* a donc été testée *in planta* par localisation histochimique de l'activité β -galactosidase dans les tissus nodulaires. L'activité β -galactosidase a été détectée dans les nodules *C. podocarpa* âgés de 6 semaines inoculés avec la souche. Cette activité enzymatique a été clairement localisée à l'apex du nodule recombinée (cf article 1 : « Fig. 2 »).

Nous avons complété ces données en effectuant un suivi de l'apparition des nodules et en effectuant des coupes longitudinales sur des nodules frais de différents âges, du stade le plus précoce où l'on observe un simple renflement de la racine à des nodules âgés de 8 semaines.

On observe que la méthylothrophie s'exprime durant toute la durée de vie du nodule toujours dans une zone bien définie, apicale, délimitée de façon distale par le cortex externe et de façon proximale par une zone contenant des bactéries libres et/ou en tout début de différenciation en bactéroïdes (Planche 1).

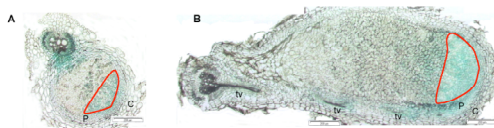


PLANCHE 1 : Expression de la méthylothrophie

En revanche, la méthylothrophie ne s'exprime plus dans la zone de fixation d'azote contenant les bactéroïdes (aucune coloration observée lors de la révélation histochimique). Les bactéroïdes matures semblent donc avoir perdu leur capacité méthylothrophique par extinction de l'expression de leurs gènes.

II.2. Ontogenèse nodulaire

Parmi les différentes étapes du processus d'infection connues (cf. Fig. 3), nous avons pu mettre en évidence la déformation des poils absorbants pouvant traduire la reconnaissance des facteurs Nod par les racines de la plante (Planche 2A).

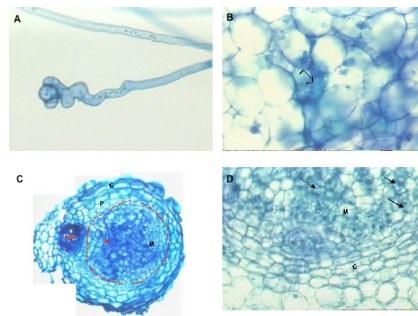


PLANCHE 2 : Processus d'infection

On observe "l'attachement" des rhizobia aux poils absorbants de la racine marquant ainsi le début de l'infection, toutefois aucune formation de structures tubulaires semblables à des cordons d'infection, guidant les rhizobia à l'intérieur des tissus de la plante, n'a été observée.

On note également (i) la formation d'un primordium racinaire, (ii) la présence de bactéries libres dans les espaces intercellulaires de ce primordium (Planche 2B et C) et (iii) la présence d'un méristème apical avec des divisions cellulaires actives (Planche 2D).

II.3. Histologie du nodule

De nombreuses études ont déjà décrit l'histologie des nodules indéterminés, notamment chez le genre *Medicago*. La compartimentation interne de ces nodules, révélée notamment par l'étude de Vasse et *al.* (1990) (Planche 3A), nous a servi de référence afin de déterminer la compartimentation observée au sein des nodules de *C. podocarpa*.

II.3.1. Compartimentation observée dans les nodules de *Crotalaria podocarpa*

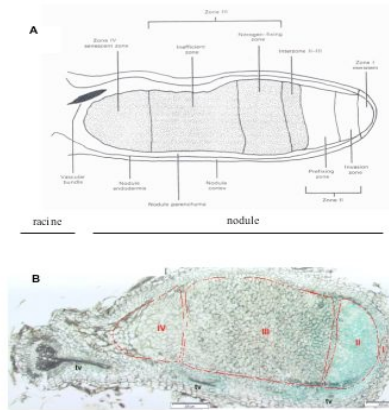


PLANCHE 3 : Compartimentation du nodule de *Crotalaria podocarpa*

De la partie distale (apicale) à la partie proximale (basale), 4 zones ont été individualisées :

- une zone méristématique ou zone I, contenant des cellules non infectées, mise en évidence sur les nodules jeunes mais jamais observée sur les coupes de nodules âgés de plus de trois semaines.
- une zone d'expression de la méthyliotrophie, contenant des bactéries libres non différenciées dans la partie la plus distale, co-existantes avec des formes différenciées en bactéroïdes dans la partie proximale (Planche 3B et 4A). Cette zone se caractérise par un tissu végétal jeune avec des cellules au cytoplasme dense, très actif (Planche 4A). On y note la présence d'amyloplastides intracellulaires.
- une zone contenant des cellules hôtes infectées ou zone III, probablement zone de fixation de l'azote, contenant des nombreux bactéroïdes différenciés (Planche 4B) avec un « gradient de remplissage » cellulaire. Les cellules sont ainsi de plus en plus vacuolisées de la partie distale vers la partie proximale révélant un âge plus avancé des cellules végétales. On note également la présence de nombreux amyloplastides intracellulaires compressés le long des parois des cellules infectées.
- une zone de sénescence ou zone IV, contenant des cellules végétales très vacuolisées.

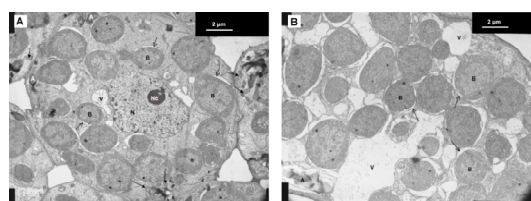


PLANCHE 4 : Bactéroïdes

Nous avons effectué une étude plus approfondie de deux des quatre zones définies ci-dessus, la zone d'expression de la méthyliotropie et la zone de fixation d'azote, puisque c'est à l'intérieur de celles-ci que sont observées les originalités de notre modèle d'étude.

II.3.2. Zone d'expression de la méthyliotropie

Dans la partie la plus distale de la zone d'expression de la méthyliotropie, on peut observer une dégradation progressive des parois cellulaires de cette zone nettement mise en évidence par la coloration des coupes au calcofluor, colorant spécifique des microfibrilles de cellulose.

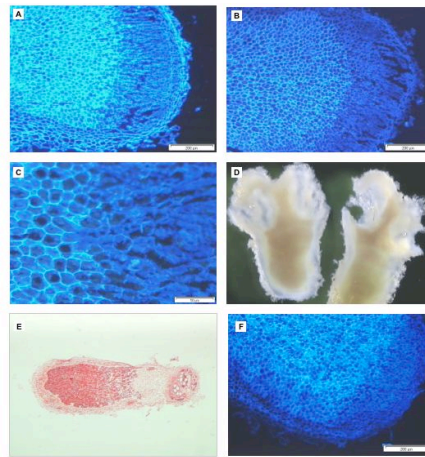


PLANCHE 5 : Dégradation apicale

Sur des nodules âgés de 2 à 3 semaines, on observe dans un premier temps une désorganisation des parois cellulaires végétales dans cette zone. Ensuite, sur des nodules âgés de 4 à 5 semaines, on constate une digestion des parois des cellules de la zone tout en maintenant l'intégrité des cellules du cortex externe (Planche 5A, B et C).

A un stade plus tardif de développement, sur des nodules âgés de plus de 6 semaines, une digestion des cellules du cortex externe a lieu, formant des « cavités » à l'apex des nodules (Planche 5D).

Pour appuyer, l'hypothèse d'une dégradation apicale directement liée aux propriétés méthyliotropiques de la bactérie, deux expérimentations supplémentaires ont été menées qui sont présentées ci après.

Tests de la capacité M. nodulans ORS 2060 à métaboliser les pectines méthylées et la cellulose :

Les bactéries sauvages (ORS 2060), méthylophiles négatives (mutant ORS 2060 A5 et B5) ainsi qu'un témoin négatif (*Bradyrhizobium* sp. ORS 1810) ont été cultivés en milieu liquide minimum M72 complété par 1% de pectine à différents degrés de méthylation (ou DM) (DM 0% correspondant à l'acide polygalacturonique, DM 30%, DM 60% et DM 90%) comme seule source carbonée. Parallèlement, ces mêmes bactéries ont été ensemencées en milieu minimum M72 complété par différents pourcentages de méthanol (0,05%, 0,1% et 0,15%) (Fig. 17).

Aucune croissance bactérienne n'est observée lorsque l'acide polygalacturonique est utilisé comme source carbonée (Fig. 17A) révélant l'incapacité de la bactérie à métaboliser le squelette carboné de l'acide pectique.

En revanche, une augmentation de la densité bactérienne dans le milieu de culture est observée lorsque ce dernier est complété par de la pectine substituée par des groupements méthyl. Lorsque le degré de méthylation de la pectine est de 30%, la densité bactérienne observée est de 0,35A à 600 nm (Fig. 17B). Cette densité bactérienne atteint un maximum de 0,5A lorsque la pectine est méthylée à hauteur de 60% (Fig. 17C). Toutefois cette augmentation n'est pas linéaire avec le pourcentage de méthylation de la pectine, puisque une augmentation du degré de méthylation jusqu'à 90% n'entraîne plus d'augmentation de la densité bactérienne (Fig. 17D).

Par la culture en milieu minimum complété par du méthanol, on peut estimer que la métabolisation de la pectine DM 30% provoque une libération de méthanol directement utilisable par la bactérie d'environ 0,05% dans le milieu puisque une même densité bactérienne est observée dans ces deux conditions (Fig. 17E). De même, on peut estimer que la pectine DM 60% fournit environ 0,08% de méthanol (Fig. 17E et F). Pour un degré de méthylation plus important (DM 90%), un facteur limitant dans la mise à disposition du méthanol pour la bactérie doit intervenir : en effet, lorsque la bactérie est cultivée sur un milieu complété avec un pourcentage de méthanol supérieur (0,15%), on observe une augmentation de la densité bactérienne (0,8 A à 600 nm, donnée non présentée).

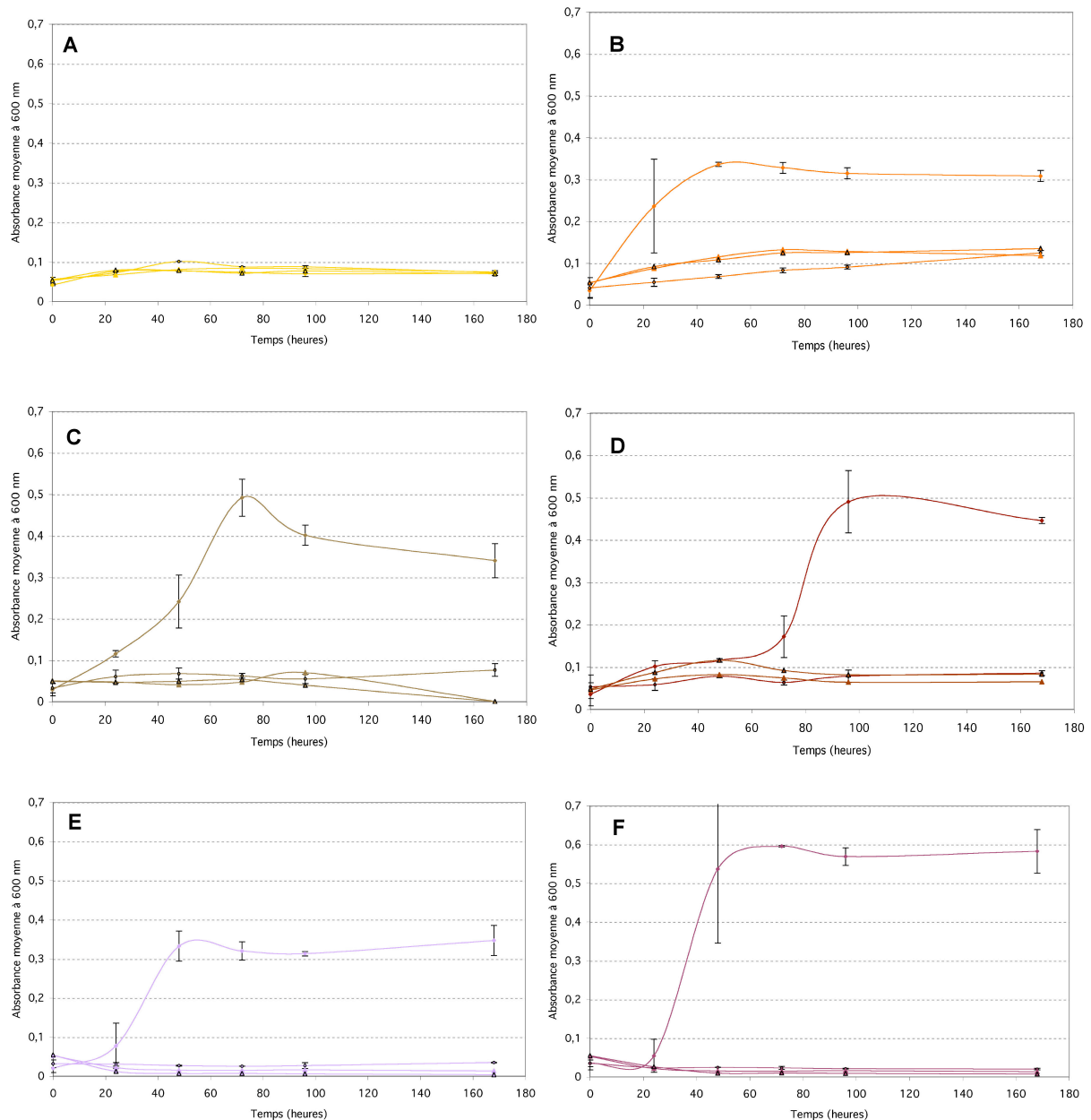


Figure 17. Comparaison de la croissance bactérienne en milieu minimum complétement avec différents substrats.

Les bactéries sauvages *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (●), méthyliotropes négatives ORS 2060 A5 (■) et B5 (▲) et *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 (◆).

La capacité de *M. nodulans* à utiliser la cellulose comme source carbonée a été testée en vérifiant la croissance de la bactérie sur milieu minimum M72 solide complétement avec 1% de cellulose. La croissance bactérienne observée présente les mêmes caractéristiques (temps d'apparition des colonies, densité bactérienne sur boîte) que celle des bactéries cultivées sur milieu riche Yeast-Mannitol. *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 est donc capable d'utiliser la cellulose comme seule source de carbone.

Inoculation par des bactéries méthylotrophes négatives et observation de la zone apicale :

La dégradation apicale observée est confirmée être en relation directe avec les propriétés méthylotrophiques. En effet, sur des coupes de nodules de plants de *C. podocarpa* inoculés avec des bactéries *M. nodulans* mutées dans le gène *mxoF* (mutant B5) et *mxoW* (mutant M7), aucune dégradation pariétale apicale et intranodulaire n'a pu être détectée (Planche 5E et F). Les cellules localisées à la zone d'expression de la méthylotrophie, non colorées, conservent donc leur intégrité membranaire lorsque le partenaire bactérien ne possède plus ces propriétés méthylotrophes.

II.3.3. Zone III ou zone potentiellement fixatrice d'azote

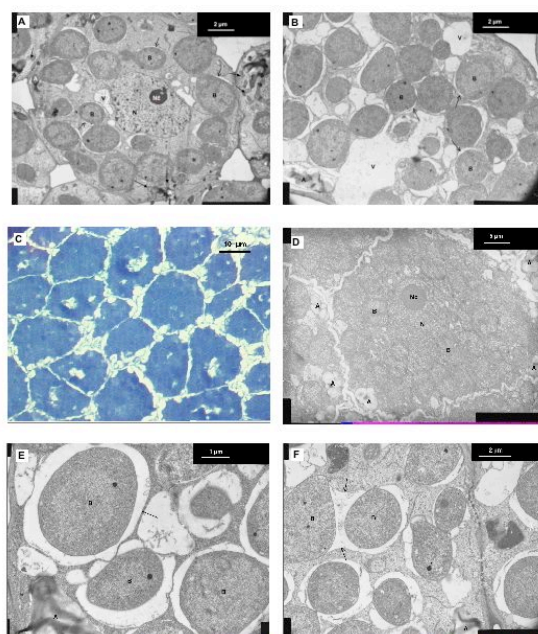


PLANCHE 6 : Zone de fixation

Au niveau de la zone potentielle fixatrice d'azote, 100% des cellules sont infectées, ce qui laisse envisager un envahissement avant divisions cellulaires plutôt qu'un envahissement par cordon d'infection (Planche 6C et D).

Les cellules hôtes infectées de cette zone III présentent deux particularités majeures chez les nodules de *C. podocarpa*. D'une part, les bactéroïdes présentent une taille et une forme inhabituellement rencontrées dans les nodules indéterminés. Ainsi, les bactéroïdes de *M. nodulans* ORS 2060 présentent une forme sphérique à légèrement elliptique, de plus de 5 µm de diamètre pour les formes le plus matures (Planche 6E). On observe une interaction

physique étroite entre la membrane du symbiosome et la membrane externe du bactéroïde. Généralement chez les nodules indéterminés, un bactéroïde unique est retrouvé au sein de chaque membrane de symbiosome. Toutefois, sur l'ensemble des observations effectuées, nous avons pu mettre en évidence un cas de symbiosome partagé par deux bactéroïdes (Planche 6F). D'autre part, on note de façon constante, la présence exceptionnelle d'amyloplastes intracellulaires dans les zones infectées du nodule (Planche 7A).

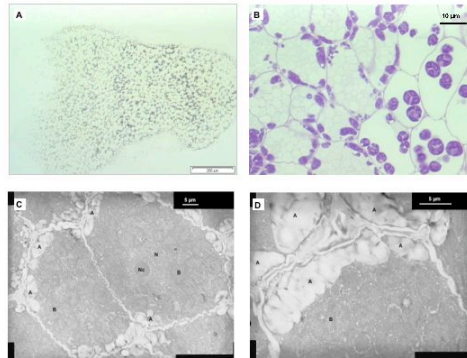


PLANCHE 7 : Présence d'amyloplast

Comme noté sur la plupart des observations, les amyloplastes dans les cellules infectées sont repoussés, compressés, le long des parois des cellules (Planche 7C et D). Dans les cellules non infectées, comme celles du parenchyme nodulaire, les amyloplastes présentent une forme classique (Planche 7B).

III. Discussion générale

"When the living plant cell must live with another organism which is actually part of its protoplasm, it is necessary that a subtle balance must exist between the growth of the plant and the growth of the bacterium" (Beijerinck, 1888).

III.1. Structure du nodule de *Crotalaria podocarpa* en symbiose avec *Methylobacterium nodulans*

Les nodules de crotalaires ont été identifiés comme étant de type indéterminé chez *C. perrottetii* (Sy et al., 2001) et *C. podocarpa* (Jourand, 2003) sur la base de leur morphologie : nodules très allongés le plus souvent multilobés.

À partir du modèle de nodule indéterminé de *Medicago*, nous avons caractérisé le nodule fixateur d'azote de *C. podocarpa* en symbiose avec *M. nodulans* ORS 2060.

De la partie distale (apicale) à la partie proximale (basale), nous avons pu caractériser :

- une zone méristématique (I), persistante jusqu'à 3-4 semaines de développement puis non détectée supposant un arrêt de l'activité méristématique, une fois la taille finale atteinte, puis apparition ensuite de nouveaux méristèmes induisant les lobes latéraux.
- une zone d'expression de la méthylotrophie qui subit de profonds remaniements histologiques durant la durée de vie du nodule.
- une zone de fixation d'azote (III) accumulant de l'amidon.
- et une zone de sénescence (IV).

III.2. Singularités et conséquences des propriétés méthylotrophiques du partenaire bactérien sur sa plante hôte

Les propriétés méthylotrophiques de *M. nodulans*, à savoir la capacité à utiliser le méthanol comme source carbonée, induisent de profonds changements dans le développement des nodules de *C. podocarpa* comparés aux autres nodules indéterminés connus.

Ainsi pour expliquer les dégradations apicales observées sur les nodules, nous émettons l'hypothèse développementale suivante.

Le méthanol est le premier sous-produit du métabolisme durant la synthèse de la paroi cellulaire chez les végétaux (Obendorf et *al.*, 1990 ; Sy et *al.*, 2005). En effet, les pectines sont intégrées dans la paroi sous forme hautement méthylestérifiées pouvant être par la suite métabolisées par des pectinases, tels que des pectines méthylestérases (PMEs). Ces PME catalysent la déméthylestérification en homogalacturonanes libérant des acides pectiques et du méthanol (Fig. 18 ; Micheli, 2001). Le méthanol est ainsi directement utilisable par les bactéries présentes à l'apex comme source carbonée.

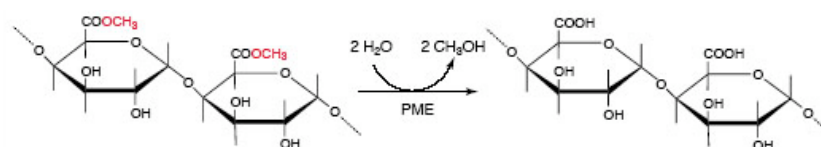


Figure 18. Déméthylestérification des pectines par les pectines méthylestérases (PME).

D'après Micheli (2001).

Ainsi, lors de la croissance du nodule et la présence d'un méristème actif, les bactéries peuvent utiliser le méthanol issu du métabolisme des parois cellulaires (Fig. 19A).

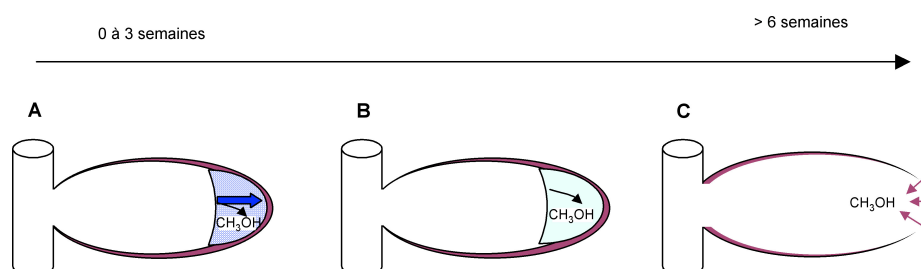


Figure 19. Représentation schématique de la dégradation apicale intervenant chez les nodules de *C. podocarpa*.

A : nodule en croissance, le méthanol est fourni par l'expansion cellulaire. B : arrêt de l'activité méristématique, le méthanol est fourni par la désorganisation et la dégradation des parois cellulaires des cellules présentes dans la zone d'expression de la méthylotrophie. C : nodule âgé, le méthanol est fourni par la dégradation du cortex externe.

Abréviation : CH₃OH : méthanol.

Lors de l'arrêt de l'activité méristématique, les divisions cellulaires et la croissance du nodule cessent, bloquant ainsi l'apport en méthanol pour la bactérie (Fig. 19B). Dans le même temps, la désorganisation et la digestion progressive des parois des cellules présentes dans la zone

d'expression de la méthyliotropie ont lieu. Du fait de la capacité de *M. nodulans* à dégrader la cellulose ainsi que les pectines méthylées *in vitro*, nous supposons que, pour se fournir en méthanol, la bactérie dégrade les parois végétales, par déméthylation des pectines et métabolisation de la cellulose.

Lorsque l'espace défini par la zone d'expression de la méthyliotropie est lysé, les bactéries poursuivent leur dégradation pariétale sur les cellules végétales du cortex externe nodulaire. On observe alors une "cavité" à l'apex du nodule permettant une libération des bactéries libres dans la rhizosphère.

III.3. Energie allouée à la différenciation des bactéries en bactéroïdes

La différenciation des bactéries en bactéroïdes implique de nombreux remaniements ultrastructuraux. De plus, les plantes formant des nodules indéterminés imposent un programme d'endoreduplication génomique aux cellules bactériennes invasives. Les bactéroïdes au sein de ces nodules indéterminés augmentent ainsi leur contenu en ADN et leur taille cellulaire, ce qui leur permet d'atteindre une vitesse métabolique plus élevée pour supporter la fixation d'azote (Mergaert et *al.*, 2006).

Un apport constant en carbone est donc nécessaire pour fournir métabolites et énergie pour la différenciation des bactéroïdes (Jones et *al.*, 2007). En 2005, Ludwig et *al.* proposaient que les réserves de poly-hydroxy-butyrate (PHB) bactériennes soient mobilisées pendant la différenciation des bactéroïdes pour aider à alimenter le « burst » du métabolisme carboné nécessaire pour convertir les bactéries libres en de beaucoup plus grands bactéroïdes différenciés. Cette hypothèse s'est trouvée confortée par les études antérieures d'ultrastructures du nodule montrant la présence de granules de PHB dans les cellules bactériennes à l'intérieur du cordon d'infection (Paau & Cowles, 1978). Lors du processus de différenciation vers l'état bactéroïdes, les granules de PHB disparaissent et les bactéroïdes matures sont dépourvus de granules visibles (Korotkova & Lidstrom, 2001 ; Ludwig et *al.*, 2005). La synthèse de PHB a donc lieu mais elle est probablement accompagnée par une vitesse équivalente de dégradation et ainsi aucune accumulation suffisante ne permet la formation de granule détectable par microscopie électronique (Kim & Copeland, 1996).

La forme sphérique, et surtout la taille singulière des bactéroïdes de *M. nodulans* supérieure à 5 µm de diamètre, laisse présager une demande énergétique très importante. A titre

comparatif, les bactéroïdes de *Sinorhizobium melliloti* retrouvés dans les nodules de *Medicago truncatula* présente une forme allongée (4 μm x 1 μm) (Vasse et al., 1990). Une taille équivalente est également observée pour les bactéroïdes de *Rhizobium* sp. dans les nodules d'*Arachis hypogaea* (Chandler, 1978). Il existe également des formes plus petites, de moitié environ, tels que les bactéroïdes d'*Azorhizobium caulinodans* observés dans des nodules de *Sesbania rostrata* (N'Doye et al., 1994), les bactéroïdes de *Rhizobium* sp. ORS 322 chez *Aeschynomene afraaspera* (Alazard et Duhoux, 1990) ou encore *Sinorhizobium fredii* chez *Glycine max* (Krishnan et al., 2003). Une forme elliptique de bactéroïdes est tout de même référencée pour *Rhizobium galelae* en symbiose avec sa plante hôte *Galega orientalis*, mais contrairement à *M. nodulans*, les bactéroïdes sont de petite taille (1 μm x 0,5 μm) (Vassileva & Ignatov, 2002).

Ainsi, du fait de la taille inhabituellement grande des bactéroïdes de *M. nodulans*, nous émettons l'hypothèse que la demande énergétique doit être plus importante que dans les cas classiques. Cet apport d'énergie supplémentaire pourrait ainsi être fourni par le métabolisme du méthanol issu de la dégradation des parois cellulaires végétales.

III.4. Stockage de l'énergie carbonée par la plante

Un autre point de discussion important concerne l'énergie sous forme d'apport carboné fournie par la plante. Cette énergie est utilisée pour alimenter l'activité nitrogénase au sein des bactéroïdes et fournir des squelettes carbonés pour l'intégration de l'azote fixé. C'est pourquoi, une accumulation de réserves carbonées de la plante, notamment sous forme d'amidon, est généralement observée dans l'interzone II-III. Cette interzone est hautement significative pour le développement du nodule car elle représente la transition des bactéries libres, présentes en zone II, en bactéroïdes fixateurs d'azote, présents en zone III, où les réserves carbonées utilisées sont celles de la bactérie (Vasse et al., 1990 ; Lodwig et al., 2005). Il est en effet observé en microscopie optique, dans le nodule modèle de *Medicago* (Vasse et al., 1990), une zone de une à trois couches cellulaires présentant des cellules hôtes infectées avec des amyloplast. Tandis que ce dépôt d'amidon définit une limite nette avec la partie distale de la zone II, la frontière proximale de cette interzone est moins bien marquée.

La réduction de l'azote atmosphérique en ammonium requiert une grande quantité d'énergie métabolique pour casser la triple liaison entre les deux atomes d'azote (Kahn et al., 1998).

Philips (1980) estimait que pour chaque gramme de N₂ fixé, 5-10 g de carbone étaient requis. La fixation nodulaire de l'azote en ammonium est donc alimentée principalement par les photosynthétats de la plante.

Des études de marquage ont montré que le premier photosynthétat transmis, de la racine au nodule, est le saccharose (Gordon et *al.*, 1985, 1999). Au sein du cytosol des cellules végétales du nodule, le saccharose est clivé par une « nodule-enhanced sucrose synthase » (Hohnjec et *al.*, 1999) et ensuite catabolisé par la glycolyse (Kaminski et *al.*, 1998). La phosphoenolpyruvate carboxylase intervient ensuite dans la carboxylation en phosphoenolpyruvate pour générer de l'oxaloacétate, lequel peut être utilisé pour la synthèse d'aspartate ou d'asparagine ou pour la réduction en malate par la malate deshydrogénase dans le but d'alimenter le métabolisme du bactéroïde (Schulze, 2004 ; Barsch et *al.*, 2006). Les dicarboxylates fournis par la plante sont ensuite métabolisés via le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) dans le bactéroïde (Fig. 20) (Lodwig et *al.*, 2005).

L'activité respiratoire fournit alors à la nitrogénase 16 ATP et 8 électrons requis pour réduire une molécule de N_2 en deux molécule de NH_4^+ (Poole & Allaway, 2000).

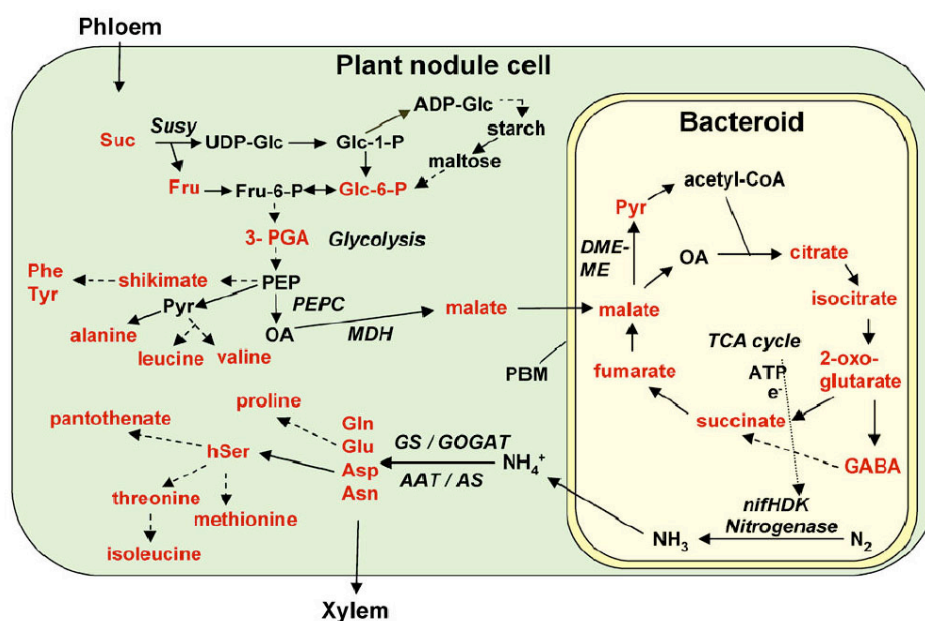


Figure 20. Représentation schématique du métabolisme du nodule.

Les métabolites en rouge, sont significativement plus important dans le nodule comparé à la racine.

Abréviations : AAT, aspartate aminotransférase ; AS, asparagine synthétase ; Asn, asparagine ; Asp, aspartate ; hSer, homosérine ; MDH, malate déhydrogénase ; DME-ME, NAD-dependent malic enzyme ; Fru, fructose ; GABA, 4-amino butyric acid ; Glc, glucose ; Gln, glutamine ; Glu, glutamate ; GOGAT, glutamate synthase ; GS, glutamine synthétase ; OA, oxaloacétate ; PBM, peribacteroid membrane ; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase ; 3-PGA, glyceric acid 3-P ; Phe, phenylalanine ; Pyr, pyruvic acid ; Suc, sucrose ; Susy, sucrose synthase ; Tyr, tyrosine.

Issue de Barsch et *al.*, 2006.

Cette forte demande énergétique n'autorise donc pas la plante à stocker des réserves carbonées dans les cellules infectées où la fixation d'azote a lieu. C'est pourquoi, les amyloplastés présents dans l'interzone II-III disparaissent progressivement dans la zone III ou zone fixatrice d'azote.

Ainsi, et ce de façon très inattendue, nous avons observé une co-existence, au sein des cellules végétales infectées, d'amyloplastés et de bactéroïdes de *M. nodulans* dans les nodules de *C. podocarpa*.

Hormis la partie tout à fait distale, cette accumulation s'étend à l'ensemble du nodule de la partie proximale de la zone d'expression de la méthyliotropie (où coexistent des formes différenciées et non différenciées de la bactérie) à l'ensemble de la zone de fixation d'azote.

Cette accumulation d'amyloplastés a toutefois déjà été rapportée dans la littérature, mais dans tous les cas, il s'agissait d'études de souches bactériennes mutantes. A titre exemple, les pseudonodules (formation de type nodule exempts de bactérie) induits par des mutants exo^- incapables d'infecter les nodules, accumulent une forte quantité d'amidon puisqu'il n'y a pas de demande énergétique à l'intérieur du nodule par les bactéroïdes (Fig. 21A, Barsch et al., 2006). Ceci indique par ailleurs que même si ces nodules ne fournissent pas d'azote réduit à la plante, le transport des phospho-assimilats vers les nodules n'est pas éteint (Niehaus et al., 1993).

Un taux d'amidon élevé est également observé dans les nodules induits par des mutants $nifH^-$, incapables de réduire l'azote atmosphérique en ammonium, ou lorsque la fixation d'azote n'est pas efficace (Fig. 21B, Barsch et al., 2006). Dans ces nodules, un niveau élevé de transcrits de glucose-1-P adenylyltransférase indique une augmentation d'amidon du fait que l'enzyme encodée est impliquée dans la formation de ADP-glucose nécessaire pour la formation d'amidon (Barsch et al., 2006).

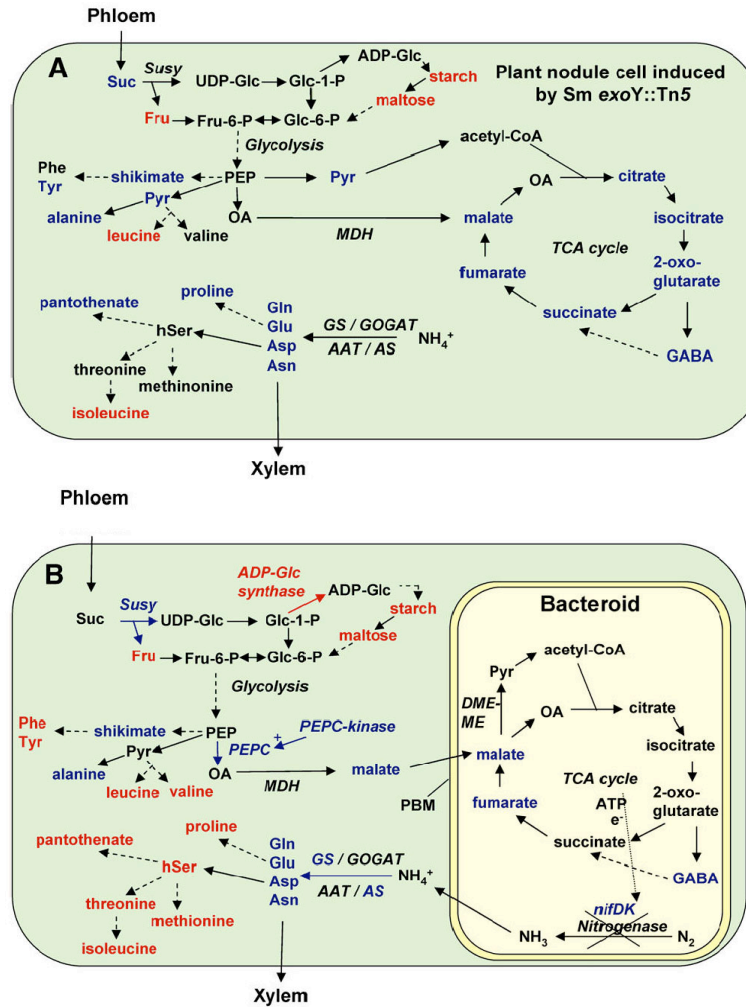


Figure 21. Représentation schématique du métabolisme dans les nodules induits par Sm1021 *exoY::Tn5* (A) and Sm1021 *nifH::Tn5* (B).

Les métabolites et transcrits de gènes signalés en rouge sont significativement plus induits dans les mutants comparés aux extraits de nodules induits par la bactérie sauvage. Inversement, les métabolites signalés en bleu sont diminués.

Abréviations : AAT, aspartate aminotransférase ; AS, asparagine synthétase ; Asn, asparagine ; Asp, aspartate ; hSer, homosérine ; MDH, malate déhydrogénase ; DME-ME, NAD-dépendant malic enzyme ; Fru, fructose ; GABA, 4-amino butyric acid ; Glc, glucose ; Gln, glutamine ; Glu, glutamate ; GOGAT, glutamate synthase ; GS, glutamine synthetase ; OA, oxaloacetate ; PBM, peribactéroïde membrane ; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase ; Phe, phénylalanine ; Pyr, pyruvate ; Suc, sucrose ; Susy, sucrose synthase ; Tyr, tyrosine.

Issues de Barsch et al. (2006).

un apport constant de saccharose a lieu, sans qu'il y ait métabolisation en aval, permettant ainsi le stockage du carbone sous forme d'amidon.

Toutefois, les bactéries différenciées en bactéroïdes semblent avoir perdu leur propriété méthylothrophique puisque aucune coloration histochimique n'apparaît dans les zones envahies par la forme différenciée des bactéries. Par ailleurs, le fait que la dégradation des parois cellulaires végétales n'est observée qu'à l'apex du nodule et ne soit pas généralisée à l'ensemble des tissus nodulaires contenant des cellules infectées conforte cette hypothèse. Cette suppression d'expression de certains gènes au sein du bactéroïde a déjà été observée pour d'autres gènes tels que les gènes de nodulation. Ceci a par exemple été démontré chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *vivciae* : les gènes nod sont éteints au niveau transcriptionnel avant que la bactérie quitte le cordon d'infection (Schlaman et al., 1991). En général, les changements transcriptionnels dans les bactéroïdes sont cohérents avec une régulation négative de la plupart des processus métaboliques et concomitants à l'augmentation de l'expression des produits des gènes impliqués dans la fixation de l'azote et la respiration (Barnett & Fisher, 2006).

Du fait que la méthylothrophie ne s'exprime qu'à l'apex du nodule, l'hypothèse de fonctionnement suggérée ci-dessus ne peut pas s'appliquer à l'ensemble de la zone de fixation d'azote. Nous supposons donc qu'il existe 4 stades de différenciation des bactéries :

- Un premier stade (S1) correspondant à la bactérie libre. Ces bactéries expriment les gènes de la méthylothrophie mais ne sont pas fixatrices d'azote.
- Ensuite, la différenciation débute : les bactéroïdes en voie de différenciation (stade S2) expriment toujours les gènes de la méthylothrophie, mais également ceux nécessaires à l'activité nitrogénase. Ces bactéroïdes sont retrouvés dans la partie proximale de la zone d'expression de la méthylothrophie et sont donc fixateurs d'azote.
- Le stade S3 représenterait les bactéroïdes différenciés matures, non méthylothrophes, fixateur d'azote, et seraient situés dans la zone fixatrice III.
- Enfin un dernier stade (S4) correspondant à des bactéroïdes sénescents, non méthylothrophes et dans lesquels l'activité fixatrice est moindre puis éteinte, serait situé dans la partie la plus proximale de la zone III et dans la zone de sénescence du nodule.

Sur la base de ces hypothèses, il existe donc au sein du nodule une zone se limitant à quelques couches cellulaires où se trouvent des bactéroïdes méthylothrophes et fixateurs d'azote.

L'énergie supplémentaire apportée par la méthylotrophie n'étant plus allouée à la différenciation des bactéroïdes, elle pourrait être redirigée pour l'activité de la nitrogénase, permettant ainsi à la bactérie de stocker l'énergie carbonée apportée par les photosynthétats en amidon d'où la présence concomitante dans ces cellules infectées de ces quelques couches cellulaires de bactéroïdes fixateurs d'azote et d'amidon.

Toutefois, ceci n'explique pas la présence d'amyloplastés dans l'ensemble du nodule. Aussi, nous formulons deux hypothèses : (i) La première serait qu'une fois l'activité nitrogénase amorcée par les bactéroïdes au stade S2, les bactéroïdes arrivant en stade S3 reprennent un métabolisme « classique » avec apport du malate du cytoplasme de la cellule végétale vers le bactéroïde, et activation du cycle TCA pour alimenter en ATP et électrons la nitrogénase sans consommer les réserves d'amidon formées. Le passage direct glucose-1P en glucose-6P court évitant le cycle de stockage en amidon (Fig. 22). (ii) La seconde hypothèse serait que, bien que la fixation d'azote dans les nodules de *C. podocarpa* soit efficace, il pourrait exister un gradient d'efficacité de la fixation d'azote par les bactéroïdes au sein de la zone comme cela a été montré chez *Medicago* (Vasse et al., 1990). On peut alors supposer que seuls les bactéroïdes au stade S2 situés dans la partie distale de la zone III sont fixateurs, et qu'ainsi, la fixation de l'azote par la nitrogénase est toujours associé à une activité méthylotrophique fonctionnelle. Actuellement, aucun argument ne permet de privilégier l'une ou l'autre des hypothèses émises.

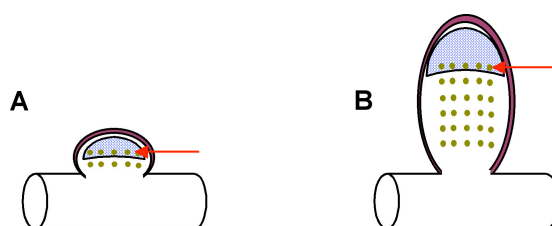


Figure 23. Remplissage du nodule par les amyloplastés.

En bleu la zone d'expression de la méthylotrophie, la flèche indique la partie distale de la zone d'expression de la méthylotrophie contenant des bactéroïdes méthylotrophes et fixateurs d'azote "producteurs" d'amidon (S2).

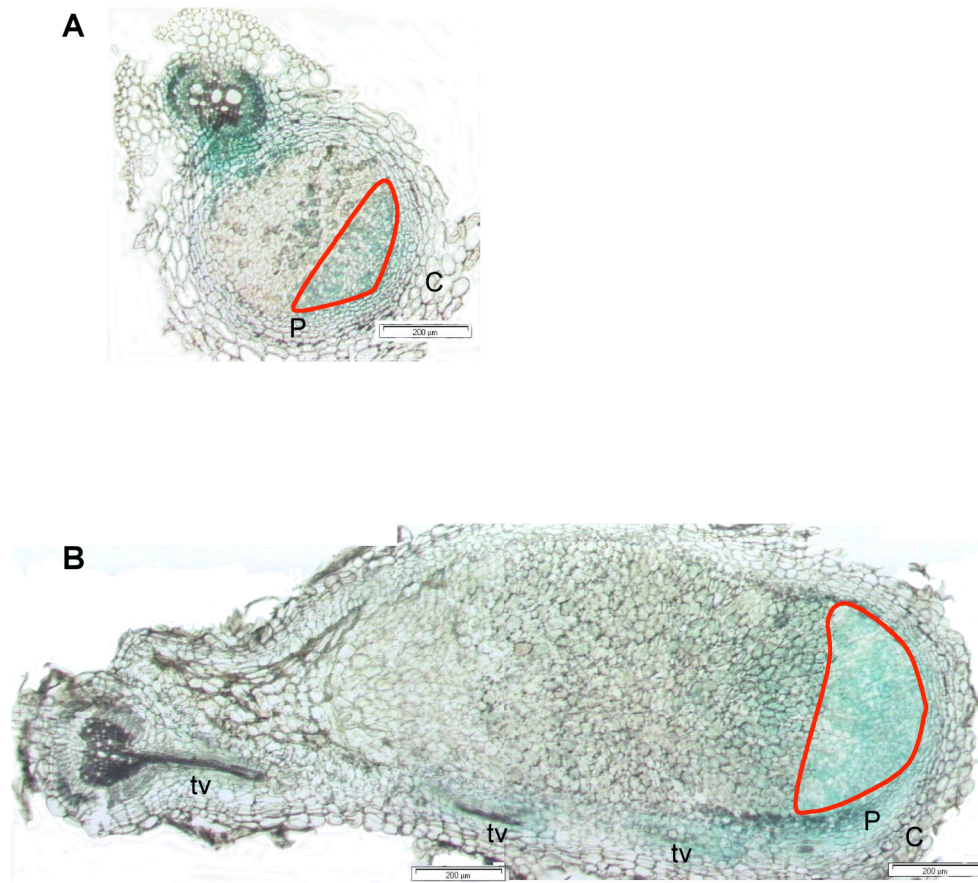
La localisation de ces bactéroïdes suit la croissance du nodule de A en B, remplissant ainsi au fur et à mesure le nodule d'amyloplastés.

Dans ce deux hypothèses, une fois formé, l'amidon n'est pas dégradé et le remplissage du nodule en amyloplastés résulte simplement de sa croissance et de "l'avancée" de l'interzone expression de la méthylotrophie – fixation d'azote contenant les bactéroïdes au stade S2 (Fig. 23).

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

PLANCHE 1 :

Expression de la méthylothrophie dans le nodule de *Crotalaria podocarpa*

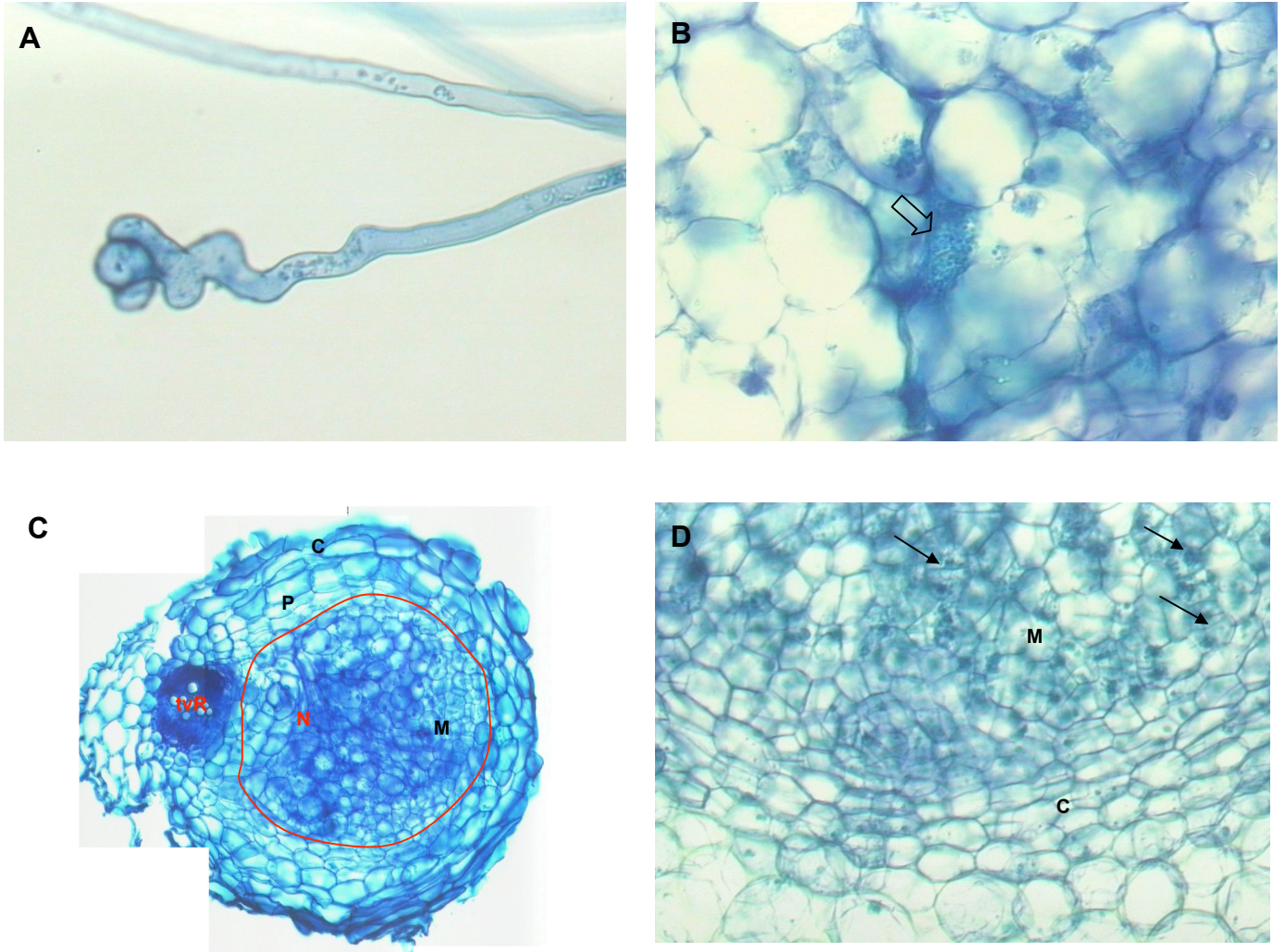


Coupes transversales (30 μm d'épaisseur) avec localisation histochimique de l'activité β -galactosidase dans les nodules de racines de *Crotalaria podocarpa* âgés de 6 jours (A) et 35 jours (B) induits par la souche bactérienne recombinée *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 contenant une fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur LacZ dans le promoteur du gène *mxαF*

Abréviations : C : cortex P : parenchyme tv : tissus vasculaires

PLANCHE 2 :

Processus d'infection



A. Courbure d'un poil absorbant de *Crotalaria podocarpa* en présence de *Methylobacterium nodulans*.

B. Présence de bactéries (flèche creuse) dans les espaces intercellulaires dans la zone méristématique du primordium nodulaire.

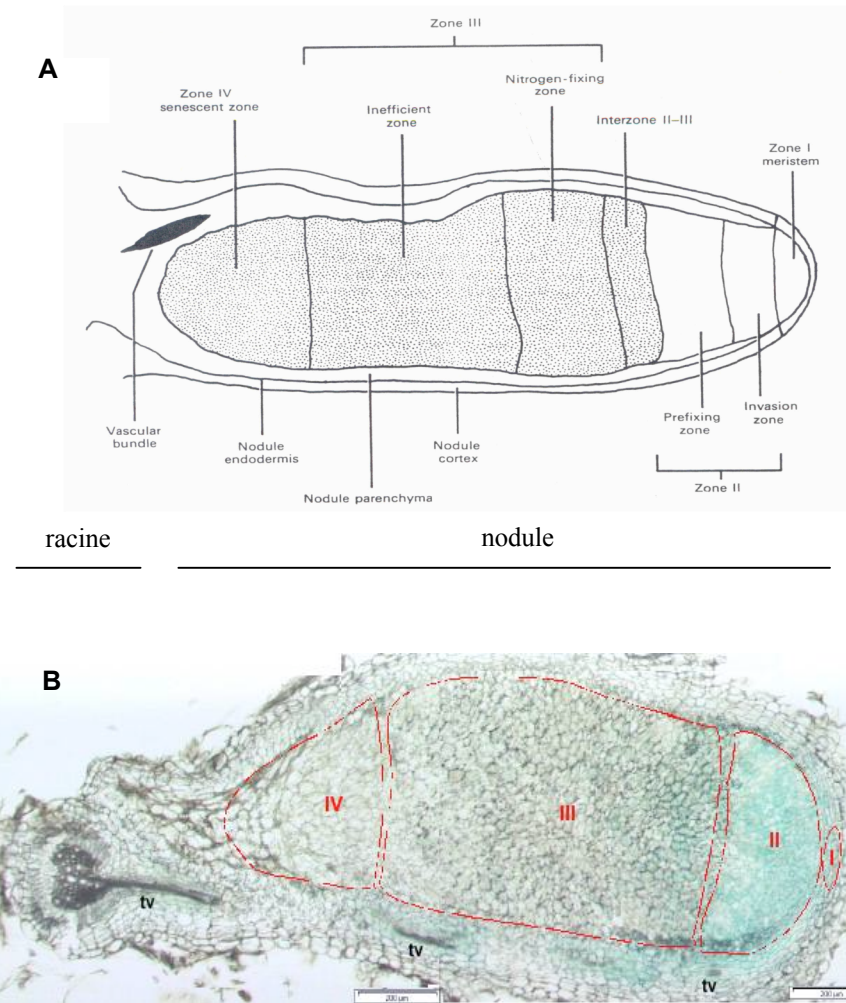
C. Primordium nodulaire (rouge) observé à partir d'une coupe transversale de racine de *C. podocarpa* renflée.

D. Coupe transversale du primordium nodulaire dans la zone méristématique. Les flèches indiquent des cellules en cours de divisions.

Abréviations : C : cortex, M : méristème N : nodule, P : parenchyme, tvR : tissus vasculaires racinaires.

PLANCHE 3 :

Compartimentation du nodule de *Crotalaria podocarpa*



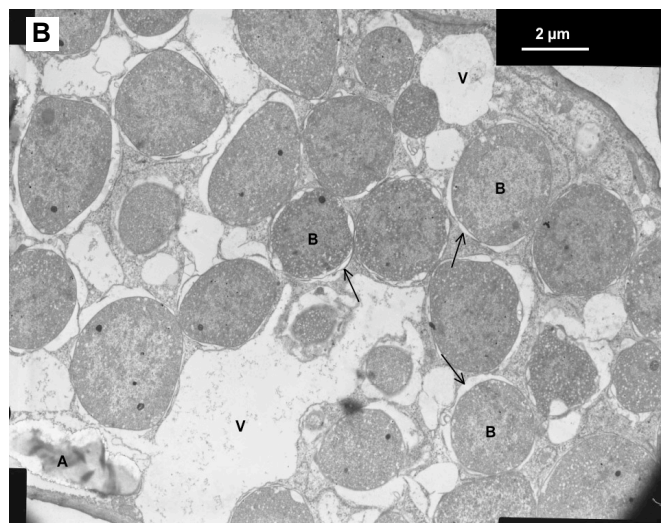
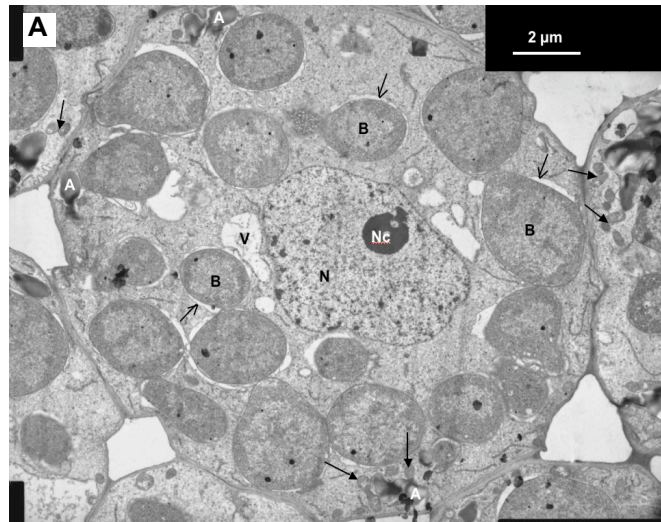
A. Représentation schématique des zones observées au sein des nodules de *Medicago*

B. Détermination des zones au sein du nodule de *C. podocarpa*. I : zone méristématique, II : zone d'expression de la méthylotrophie, III : zone de fixation d'azote, IV : zone de senescence.

Abréviations. tv : tissus vasculaires.

PLANCHE 4 :

Bactéroïdes

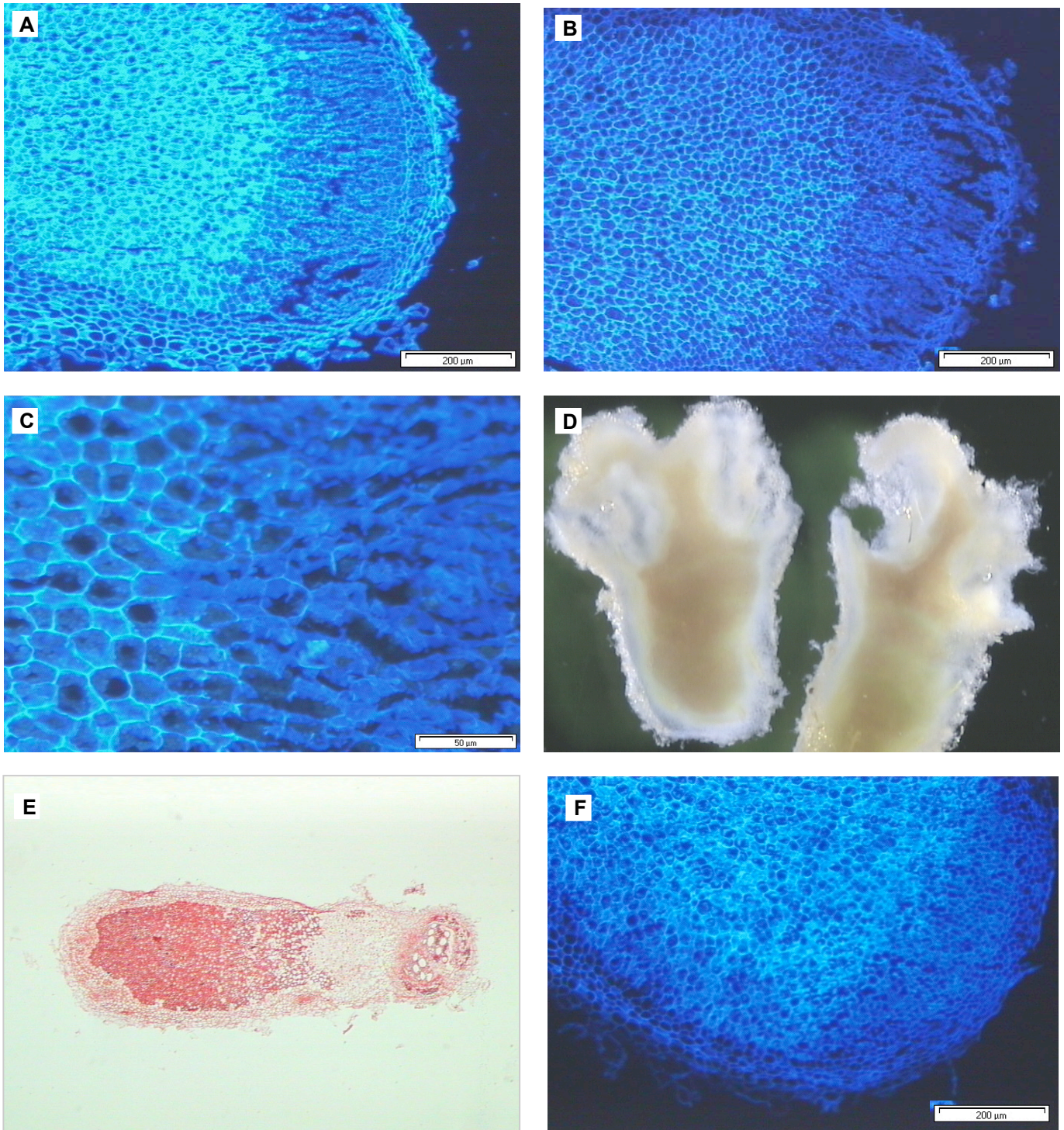


A. Cellule végétale infectée située dans la partie proximale de la zone d'expression de la méthylotrophie. On observe la présence de bactéries libres non différenciées (flèches à pointe pleine), ainsi que la délimitation des membranes des symbiosomes (flèches à pointe fine).

B. Cellule végétale infectée située dans la zone de fixation d'azote.

Abréviations. A : amyloplaste, B : bactéroïde, C : cortex, N : noyau, Nc : nucléole, V : vacuole.

PLANCHE 5 :
Dégradation apicale



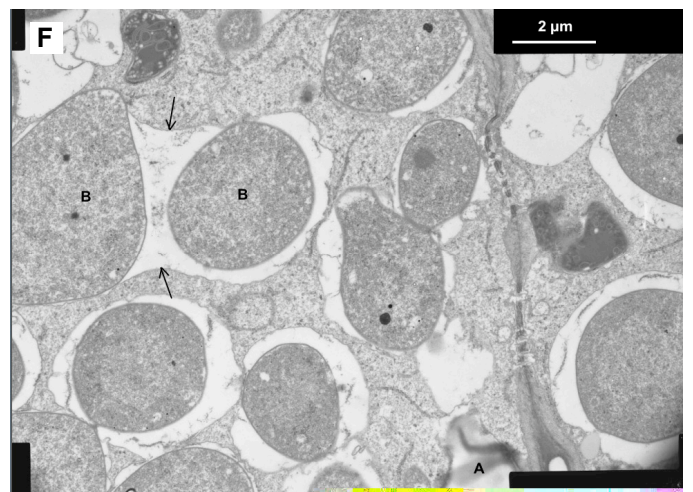
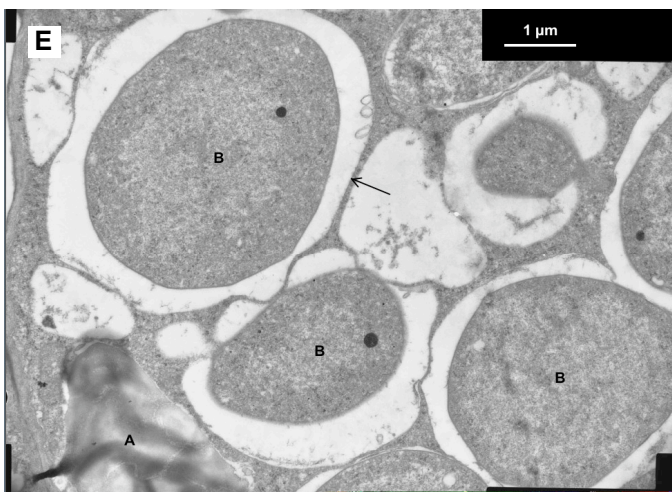
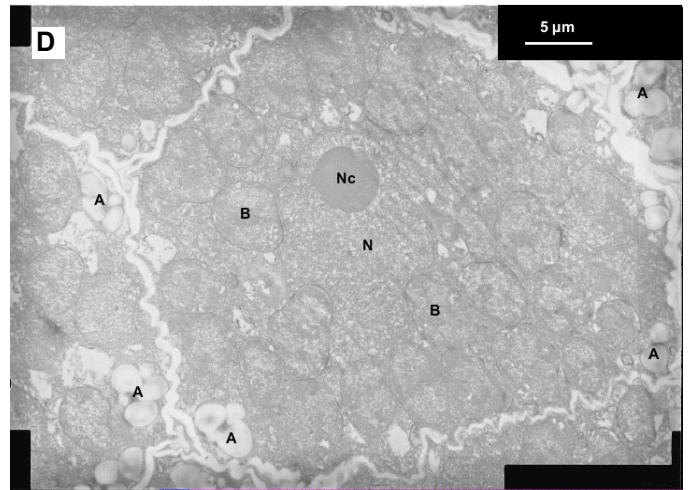
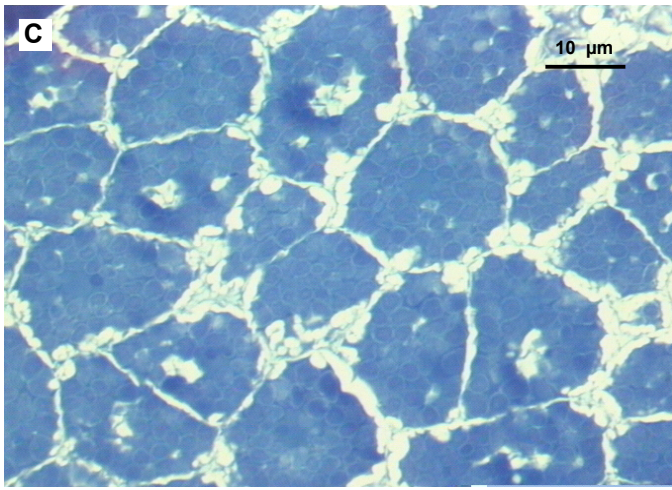
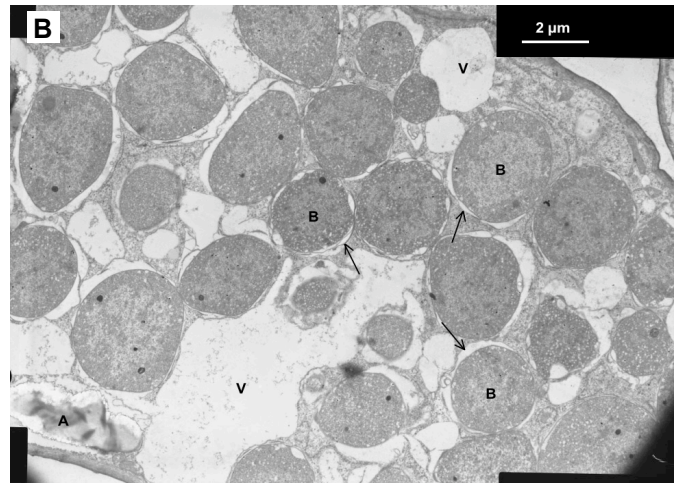
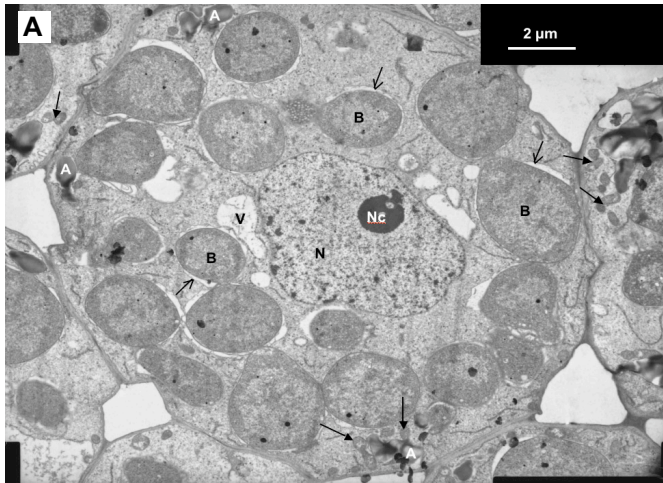
A, B, C : coupes fines transversales de l'apex de nodules de *C. podocarpa* induit par *M. nodulans* ORS 2060^T, coloration au calcofluor révélateur des parois cellulaires.

D. Nodules entiers de *C. podocarpa* inoulée avec *M. nodulans* ORS 2060^T, âgés de 6 semaines

E. Coupe transversale de nodule *C. podocarpa* inoculée avec une souche mutante de *M. nodulans* non méthylotrophe, coloration au rouge de ruthénium.

F. Coupe transversale de nodule *C. podocarpa* inoculée avec une souche mutante de *M. nodulans* non méthylotrophe, coloration au calcofluor.

PLANCHE 6 :
Zone de fixation d'azote



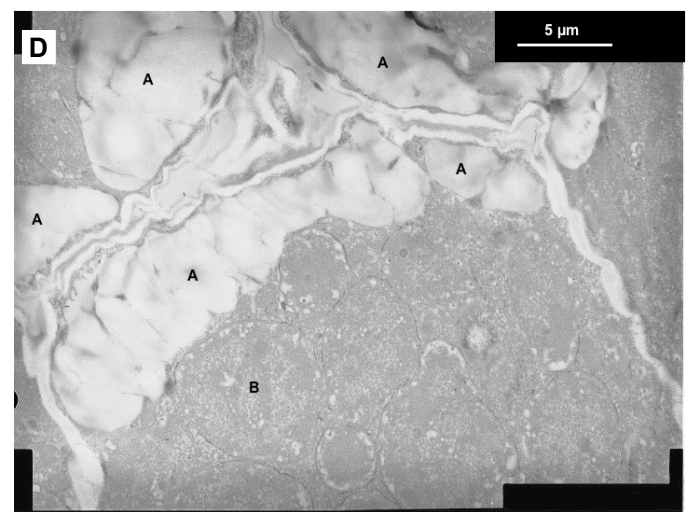
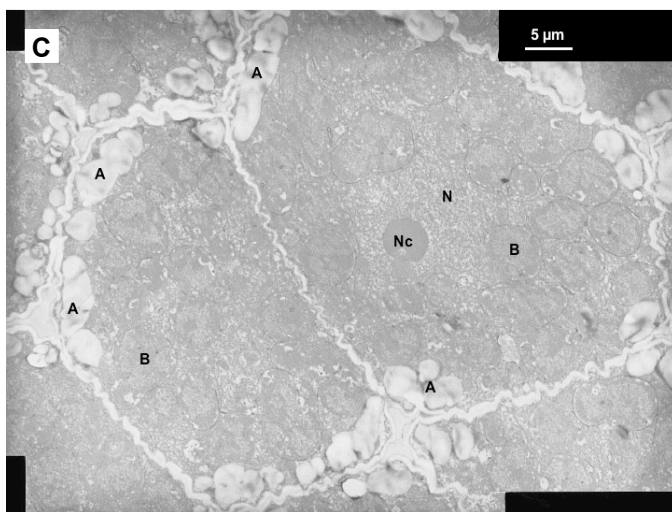
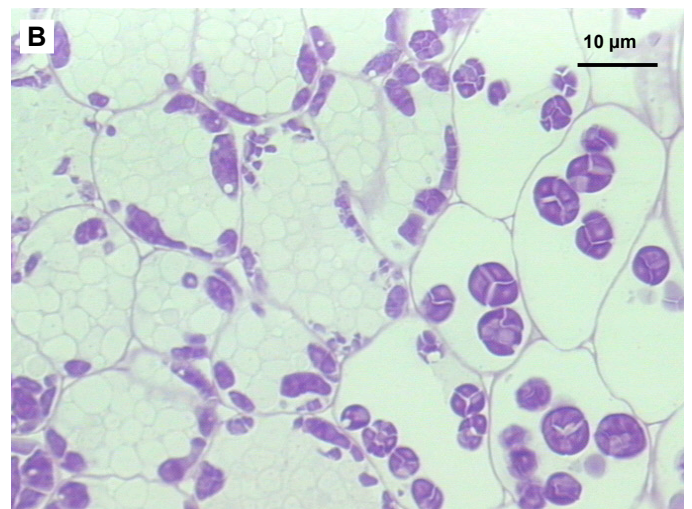
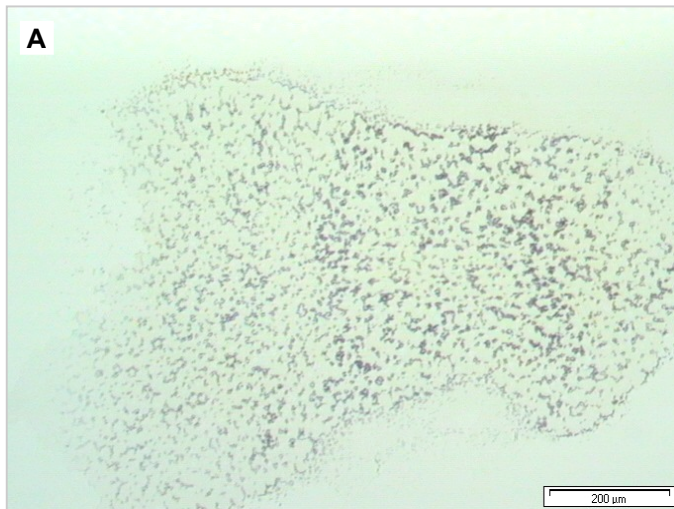
A et B (microscopie électronique à transmission) : cf. Planche 4.

C (coloration bleu de méthylène) D, E et F (microscopie électronique à transmission) : Cellules végétales infectées situées dans la zone de fixation d'azote. On observe la présence de bactéries libres non différenciées (flèches à pointe pleine), ainsi que la délimitation des membranes des symbiosomes (flèches à pointe fine).

Abréviations. A : amyloplaste, B : bactéroïde, C : cortex, N : noyau, Nc : nucléole, V : vacuole.

PLANCHE 7 :

Présence d'amyloplastes



Coupe transversale de nodule de *C. podocarpa* inoculée avec *M. nodulans*. A : coloration au iodure de potassium révélateur de la présence d'amidon, B : coloration au rouge de ruthénium, C et D : microscopie électronique à transmission.

Abréviations. A : amyloplaste, B : bactéroïde, C : cortex, N : noyau, Nc : nucléole.

CHAPITRE II

DIALOGUE MOLÉCULAIRE ENTRE LES DEUX PARTENAIRES SYMBIOTIQUES

I. Introduction

Du fait des caractéristiques atypiques de la symbiose entre *Methylobacterium nodulans* et *Crotalaria podocarpa*, telle que la nature singulière du partenaire bactérien et les conséquences, pour la plante hôte, des propriétés méthylotrophiques de ce dernier, nous avons été amenés à nous questionner sur la mise en place de cette association si spécifique en portant d'abord notre attention sur les gènes impliqués dans la spécificité d'hôte et qui pourraient être présents chez *M. nodulans*.

En effet, l'analyse génétique des rhizobia a permis d'identifier des gènes contrôlant la spécificité d'hôtes, l'infection et la nodulation. Ces gènes jouent un rôle central dans l'échange de signaux moléculaires entre les deux partenaires symbiotiques défini sous le nom de dialogue moléculaire (Dénarié et *al.*, 1993) (Fig. 6). La plante libère des composés organiques, généralement de type phénolique, qui activent l'expression des gènes nod par l'intermédiaire de protéines bactériennes NodD, protéines activatrices de transcription de la famille LysR. La nature chimique des composés sécrétés varie selon les plantes-hôtes et chaque protéine NodD est activée par un certain spectre de signaux végétaux. Les gènes nod structuraux contrôlent quant à eux la synthèse et le transport de signaux extracellulaires, les facteurs Nod (Lerouge et *al.*, 1990). Ces facteurs Nod ont une très forte activité biologique. Ils induisent chez la plante-hôte, à des concentrations de l'ordre du pico- au nanomolaire, des réponses analogues à celles induites par la bactérie elle-même, déformations de poils absorbants, divisions cellulaires et formation d'un primordium nodulaire (Truchet et *al.*, 1991 ; Schultze & Kondorosi, 1996).

Nous avons donc voulu comprendre comment les deux partenaires, bactérien et végétal, initialement indépendants pouvaient entrer en symbiose. Malgré leurs caractéristiques propres/singulières - la libération dans la rhizosphère de la crotalaire de composés toxiques de type alcaloïdes pyrrolizidiniques et les propriétés méthylotrophiques de la bactérie- nous avons émis l'hypothèse que, tout comme l'ensemble des rhizobia, un dialogue moléculaire se mettait en place entre les deux partenaires. Nous avons donc recherché la présence d'un signal plante-bactérie de type flavonoïde exsudé par la plante-hôte et, en réponse à celui-ci, un signal bactérie-plante de type facteur Nod produit par la bactérie.

De nombreuses évidences existaient quant à la mise en place d'un tel échange moléculaire puisque nous avons mis en évidence, par microscopie optique, les principales observations suggérant la présence de facteur Nod, à savoir la déformation de poils absorbants, des divisions cellulaires méristématiques et la formation d'un primordium nodulaire (cf chapitre I). De plus, l'identification du gène *nodA* codant l'acétyltransférase (Sy et al., 2001a, Jourand et al., 2004a), enzyme clé dans la construction du squelette de base des facteurs Nod, représentait un argument fort pour cette hypothèse. Néanmoins, il n'existait pas de preuve directe de la capacité de *M. nodulans* à produire des facteurs Nod. Par ailleurs, des données de la littérature récente ont démontré que les rhizobia pouvaient également induire la formation de nodules fixateurs d'azote fonctionnels sans intervention de facteurs Nod (Giraud et al., 2007). Une vérification de l'existence d'un signal plante et d'un signal bactérien était donc nécessaire.

Pour cela nous avons commencé par produire un exsudat racinaire de *C. podocarpa*. Une fois obtenu, nous avons testé la capacité inductrice de cet exsudat sur les gènes *nod* de *M. nodulans* en utilisant une souche de *M. nodulans* recombinée contenant le gène rapporteur de la β -galactosidase couplée au promoteur du gène *nodA*. Les principaux inducteurs contenus dans les exsudats racinaires, référencés dans la littérature, ayant été identifiés comme des composés phénoliques de type flavonoïde, nous avons également exploré la possibilité de la présence de ces composés dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa*. Dans le même temps, nous avons étudié la cinétique d'induction du gène *nodA* de *M. nodulans* afin de déterminer les conditions optimales à la production de facteurs Nod par la bactérie. Enfin, après avoir déterminé un inducteur efficace, nous avons produit, isolé et caractérisé des facteurs Nod.

II. Etude biochimique de l'exsudat racinaire de *Crotalaria podocarpa*

Cette étude regroupe la recherche de la capacité de l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* à induire les gènes *nod*, ainsi que l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes présents dans cet exsudat.

II.1. Production de l'exsudat racinaire

A partir de quatre boîtes de 48 puits (5,5 ml / puits) contenant 48 plantes chacune, 1056 ml d'exsudats racinaires de *C. podocarpa* ont été récoltés, centrifugés, filtrés et réduits à sec. Le résidu sec (21,9 mg) est ensuite repris dans 3 ml d'eau distillée stérile constituant ainsi l'échantillon d'exsudat racinaire à analyser. Cet échantillon d'exsudat contient 7,3 mg de résidus secs par ml.

II.2. Capacité de l'exsudat racinaire à induire les gènes *nod*

Le gène *nodA* ayant déjà été caractérisé et séquencé, une souche de *M. nodulans* avec fusion transcriptionnel *nodA-LacZ* a été construite (cf article 2, « Material et Methodes ») permettant ainsi d'analyser la capacité inductrice de différents composés sur l'expression du gène *nodA*.

Un échantillon (1 ml) d'exsudat racinaire de *C. podocarpa* stérile produit a donc été testé pour sa capacité inductrice (Fig. 24). Parallèlement, en se basant sur l'étude de Wanjala et Majinda (1999) rapportant la structure de flavonoïdes glycosylés identifiés dans les parties aériennes de *C. podocarpa* notamment de l'apigénine 7-*O*- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside, nous avons testé deux flavonoïdes standards, exogènes à la plante, la forme aglycone de l'apigénine (5 μ M) et une de ces formes glycosylées, l'apigénine 7-*O*-glcoside (5 μ M).

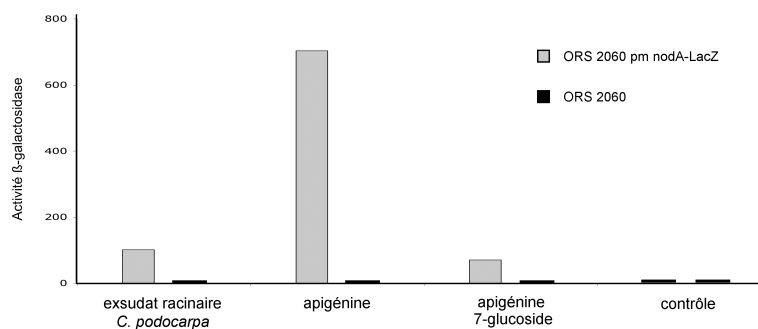


Figure 24. Induction *in vitro* du promoteur du gène *nodA* de *M. nodulans* ORS 2060 par l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* et deux flavonoïdes standards.

Vingt-quatre heures après l'induction, on observe un niveau d'activité de la β -galactosidase équivalent pour l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* et pour l'apigénine 7-*O*-glucoside, respectivement à 101 et 70 mU β -galactosidase formées par mg de protéines totales solubles. De façon plus remarquable, le niveau atteint après induction par l'apigénine est quasiment dix fois supérieur.

Ainsi, par cette expérience, on confirme l'existence d'un signal plante-bactérie efficace quant à l'induction des gènes nod malgré un niveau d'induction inférieur par rapport à l'emploi d'un inducteur exogène. Ce signal est représenté par l'ensemble des molécules contenues dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa*. Les principaux inducteurs connus ayant été identifiés comme des composés phénoliques de type flavonoïde, nous avons exploré la possibilité de la présence de ces composés dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* par chromatographie analytique.

II.3. Analyse chimique de l'exsudat racinaire par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Nous avons analysé l'échantillon d'exsudat racinaire de *C. podocarpa* par chromatographie sur couche mince de silice. Le choix de la silice pour la phase stationnaire, par rapport au support en cellulose, a été déterminé après plusieurs essais car il permet une meilleure séparation des formes glycosylées. La migration a été réalisée avec la phase mobile Wagner adaptée à la recherche des flavonoïdes, et la révélation a été effectuée par le réactif de Neu permettant, par l'observation sous lumière UV et par observation de la fluorescence, de déterminer les principales sous-classes de flavonoïdes (Wagner & Bladt, 1996).

II.3. 1. Etude préliminaire

Une étude préliminaire de flavonoïdes standards, combinée aux données de la littérature (Wagner & Bladt, 1996), nous a permis de déterminer une corrélation entre la fluorescence observée à 254 et 366 nm et la nature des composés.

Nous avons testé :

- des étalons de la sous-classe des flavones (apigénine, apigénine 7-glycoside, kaempférol et kaempférol 3-glycoside). La fluorescence observée est jaune-verte.
- des étalons de la sous-classe des flavanones (naringénine et naringénine 7-glycoside). La fluorescence observée est marron.

- des étalons de la sous-classe des isoflavones (génistéine, daidzéine et daidzine). Dans ce cas, on observe une légère trace grise à peine visible.

- des dérivés chlorogéniques (acide caféique, acide chlorogénique et acide ferulique). La fluorescence observée est bleue-violette.

Par ailleurs, les formes aglycones sont toujours retrouvées au front du solvant de migration tandis que les formes glycosilées ont un facteur de rétention (R_f) plus petit.

II.3.2. Etude de l'exsudat racinaire de *Crotalaria podocarpa*

Afin de déterminer la présence de flavonoïdes, nous avons donc analysé l'exsudat racinaire de *C. podocarpa*.

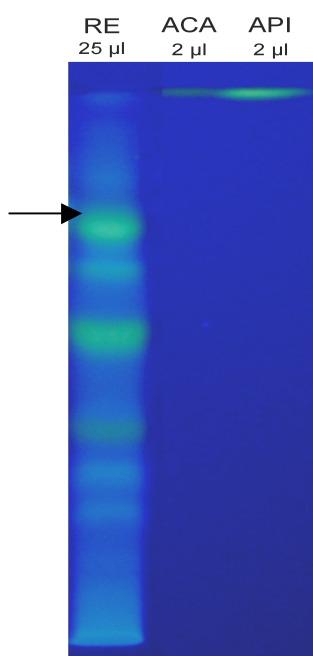


Figure 25. Analyse de l'exsudat racinaire de *Crotalaria podocarpa* par chromatographie sur couche mince.

CCM sur silice (Merck1.05721, TLC plates 20x20, Silica gel 60), migration dans la phase mobile Wagner (acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau, 100:11:11:26), révélation au réactif de Neu, observation sous UV à 254 et 366 nm. Dépôts de 25 µl pour les exsudats racinaires, 2 µl pour les flavonoïdes standards. RE : exsudat racinaire, ACA : acacétine, API : apigénine.

On observe (Fig. 25) :

- une fluorescence jaune-verte révélant la présence de composés de type flavone.
- une fluorescence bleue révélant la présence de dérivés chlorogéniques.

Par ailleurs, le facteur de rétention déterminé pour l'apigénine-7-glucoside ($R_{f_{api-7-glu}} = 0,83$) est supérieur à celui de la première bande (flèche) de fluorescence jaune-verte observée

($R_f = 0,67$) observée dans l'exsudat racinaire. Ceci suggère que les potentiels sucres liés aux flavones contenus dans l'exsudat sont moins missibles dans la combinaison phase mobile - phase liquide.

Ayant révélé la présence putative de composés de type flavones glycosylés dans l'exsudat racinaire, nous avons poursuivi la caractérisation de l'exsudat racinaire par chromatographie liquide haute performance (CLHP) dans le but d'affiner l'identification de ces composés.

II.4. Analyse chimique de l'exsudat racinaire par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

A partir du gradient utilisé par Smit et *al.* (1982), nous avons optimisé l'analyse CLHP de l'exsudat racinaire pour une meilleure séparation des composés, notamment des flavonoïdes glycosylés.

II.4.1. Etude préliminaire

Une étude préliminaire des flavonoïdes standards combinée aux données de la littérature (Mabry, 1970), nous a permis de valider notre méthode CLHP par la présence d'étalons internes. Ces flavonoïdes standards ont été analysés dans les mêmes conditions que l'exsudat racinaire et ont ainsi permis de déterminer les temps de rétention et les absorbances maximales de composés connus.

Tableau IV. Caractéristiques chromatographiques de différents flavonoïdes standards.

Flavonoïdes	Temps de rétention (min)	λ_{\max} (nm)	
		observées	théoriques
Acacétine	69,55	267, 300sh, 319	269, 303sh, 327
Acacétine 7- <i>O</i> -glucoside			268, 324
Apigénine	62,24	266, 294sh, 334	267, 296sh, 339
Apigénine 7- <i>O</i> -glucoside	46,36	266, 333	268, 333
Chrysine	69,43	245sh, 266, 313	247sh, 268, 313
Daidzéine	68,66	254sh, 260, 268	238sh, 249, 259, 303sh
Daidzine	68,72	254sh, 260, 268	256, 313sh
Génistéine	57,74	259, 330sh	261, 328sh
Génistéine 7- <i>O</i> -glucoside			261, 330sh
Naringénine	56,30	289, 330sh	289, 326sh
Naringénine 7- <i>O</i> -glucoside	42,72	282, 329sh	

Remarque : les données théoriques sont données dans le méthanol absolu.

sh : « shoulder »

En premier lieu, on observe d'une part que toutes les formes génines sont éluées lorsque que le pourcentage de méthanol de la phase mobile est proche ou égal à 100%. D'autre part, on constate une réduction du temps de rétention pour les formes glycosylées.

En second lieu, il est à noter pour ces témoins, que les absorbances maximales observées diffèrent légèrement de celles qui sont rapportées dans la littérature (Mabry, 1970).

II.4.2. Etude de l'exsudat racinaire de *Crotalaria podocarpa*

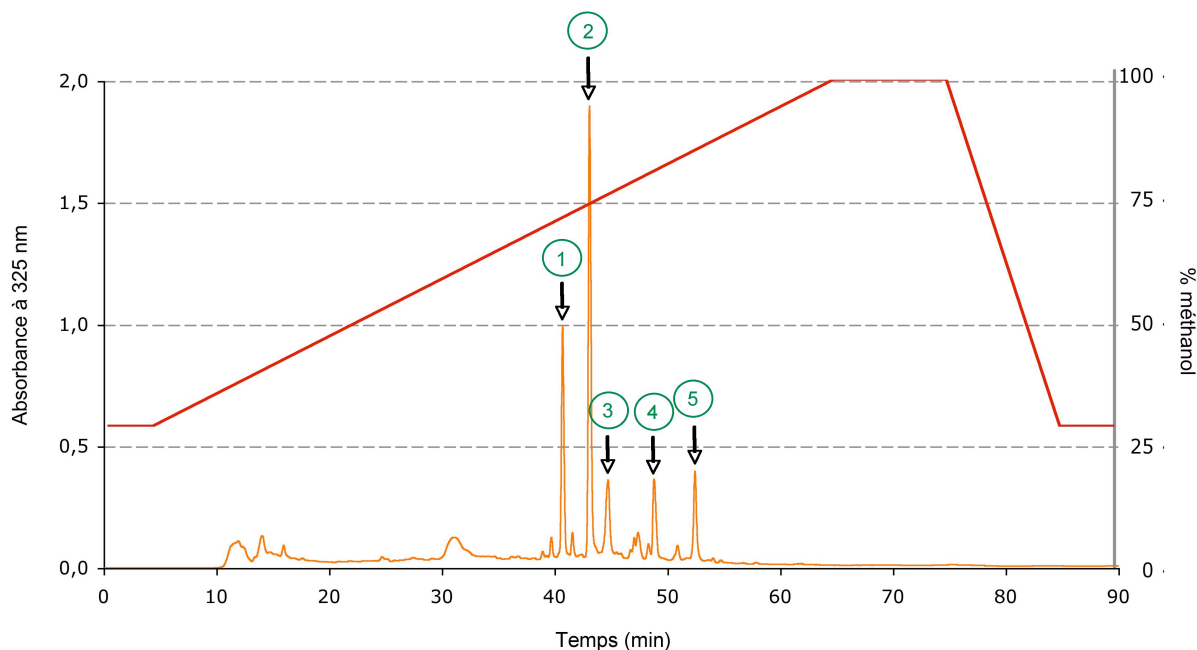


Figure 26. Chromatogramme de l'exsudat racinaire de *Crotalaria podocarpa*.

Chromatogramme d'un échantillon CLHP d'exsudat racinaire de *C. podocarpa* en orange et % de méthanol contenu dans la phase liquide (gradient méthano/eau) en rouge.

Par CLHP, nous avons détecté à cinq pics, nommés PO1 à PO5 (PO pour podocarpa), tous d'absorbance supérieure à 0,1A à 325 nm (Fig. 26).

Tableau V. Caractéristiques chromatographiques des cinqs pics déterminés.

n° du pic	Temps de rétention	λ_{\max}	
PO1	40,89	267,4	313,8
PO2	43,22	269,8	312,6
PO3	44,73	267,4	316,2
PO4	49,07	268,6	311,4
PO5	52,41	266,2	329,3

Par comparaison de profils avec les flavonoïdes standards analysés en CLHP dans l'étude préliminaire et les données de la littérature (Mabry et al., 1970), on constate que les 5 pics ont un temps de rétention caractéristiques des flavonoïdes glycosylés (Tableau V). Par ailleurs, ils possèdent tous une signature spectrale composée de deux absorbances maximales dont une

première constante autour de 268 nm caractéristique de l'apigénine et/ou de l'acacétine et une seconde autour de 313 nm pour les pics PO1 à PO4.

Le pic PO5 présente les caractéristiques plus proches de celles de l'apigénine 7-*O*-glucoside (λ_{max} 268 et 333 nm) et de l'acacétine 7-*O*-glucoside (λ_{max} 268 et 324 nm) en termes de λ maximales et temps de rétention, et ce malgré que ce dernier soit légèrement plus important suggérant que le sucre lié est moins soluble dans le méthanol que le glucose.

Par ailleurs, tous les dérivés de l'apigénine 7-*O*-sucre possède une λ max. de 268 nm et une seconde variable (Mabry, 1970). Le greffage du sucre dans une autre position entraîne une signature spectrale différente telle que pour l'apigénine 8-*C*-glucoside ou vitexine (λ_{max} 270, 303sh et 336 nm) et l'apigénine 6-*C*-glucoside ou isovitexine (λ_{max} 271 et 336 nm).

II.5. Conclusions intermédiaires

L'exsudat racinaire de *C. podocarpa* est inducteur de l'expression des gènes de nodulation de *M. nodulans*. Toutefois, cette induction est plus faible que des inducteurs exogènes sans doute en raison de la concentration de l'échantillon par rapport aux flavonoïdes exogènes utilisés. Nous avons pu déterminer que cet exsudat racinaire de *C. podocarpa* contient des flavonoïdes, appartenant à la sous-classe des flavones, dérivés glycosylés de l'apigénine ou de l'acacétine, avec un sucre lié en C-7.

Nous avons vérifié l'existence du signal plante-bactérie induisant l'expression des gènes de nodulation de *M. nodulans*. La seconde étape a donc été de vérifier l'existence du signal bactérie-plante par la production de facteurs Nod. Préalablement une étude de l'induction des gènes nod de *M. nodulans* a été réalisée.

III. Recherche des conditions optimales pour l'induction des gènes de nodulation de *M. nodulans*

Afin d'obtenir un meilleur niveau d'induction des gènes nod de *M. nodulans*, la recherche des conditions optimales de l'induction a donc été réalisée en utilisant l'apigénine comme inducteur.

III.1. Résultats

Une étude préliminaire a consisté à tester en même temps l'impact de la concentration d'inducteur et la phase de croissance de la culture bactérienne sur le niveau d'induction des gènes nod. Pour cela 3 concentrations d'apigénine (0,5, 5 et 50 μM) et quatre densités initiales bactériennes lors de l'induction (0,05, 0,1, 0,5 et 1A à 600 nm), soit 12 conditions, ont simultanément été testées, en monitorant l'activité β -galactosidase à 24 et 48 h après l'induction. Il apparaît que le plus haut niveau d'induction ait été obtenu par une concentration en inducteur de 5 μM et une densité bactérienne, lors de l'induction, comprise entre 0,05 et 0,1A à 600 nm.

A partir de ces données, nous avons pu étudier indépendamment l'effet de différentes phases de croissance bactérienne sur la concentration de l'inducteur (5 μM) et inversement, l'effet de différentes concentrations d'inducteur sur un stade particulier de la croissance de la culture bactérienne (phase précoce, 0,1A à 600 nm).

Ainsi, dans un premier temps, nous avons pu observer que l'induction des gènes nod de *M. nodulans* était significativement affectée par le délai d'addition de l'inducteur (Fig. 27).

Pour la concentration 5 μM , l'activité β -galactosidase atteint 740 milli-unités lorsque l'apigénine est ajoutée 2h après inoculation (Fig. 27B), correspondant à une densité optique bactérienne A_{600} de 0.1 (Fig. 27A). Après ce délai, l'activité diminue de plus de moitié lorsque l'induction est réalisée pendant la phase exponentielle de croissance (12 heures après inoculation, A_{600} = 0.5), et cette activité n'est plus que du tiers lorsque l'induction intervient au point d'inflexion (21,5 h après inoculation, A_{600} =1) (Fig. 27A et B).

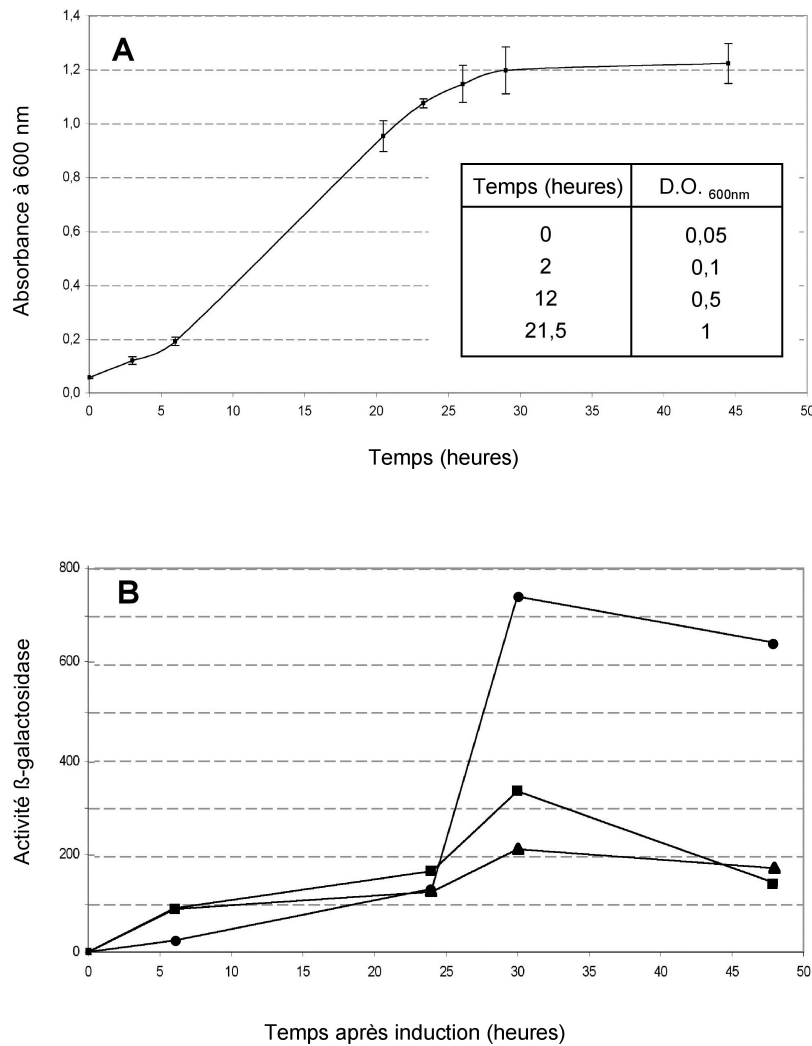


Figure 27. Effets du délai d'addition de l'apigénine sur l'activité du gène *nodA* de *M. nodulans*.

A: Courbe de croissance de *M. nodulans* ORS 2060^T en milieu YM (37°C, 170 rpm) (3 répétitions).

B: Activité β-galactosidase après addition de 5 μM d'apigénine, 2 h (●), 12 h (■) and 21,5 h (▲) après inoculation bactérienne (2 répétitions).

Par ailleurs, outre la concentration 5 μM, on note que toutes les autres concentrations testées (0,5, 1, 50 et 100 μM), présentent également une plus forte activité β-galactosidase lorsque l'inducteur est ajouté précocement à la culture bactérienne en phase de croissance comparativement à ce qui a été obtenu lorsque l'inducteur a été ajouté pendant la phase exponentielle ou au point d'inflexion (données non présentées).

Dans un deuxième temps, nous avons pu observer que l'induction des gènes *nod* de *M. nodulans* était significativement affectée par la concentration de l'inducteur (Fig. 28).

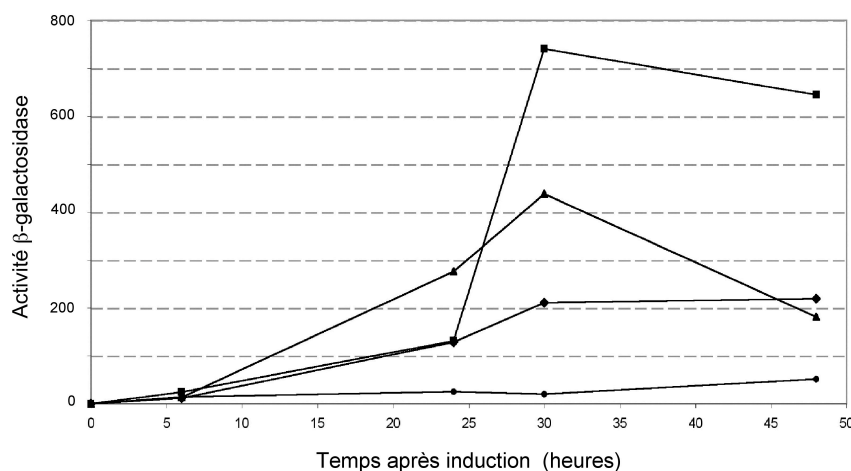


Figure 28. Effets de la concentration en inducteur sur l'activité du gène *nodA* de *M. nodulans*. L'apigénine 0,5 μM (◆), 5 μM (■), 50 μM (▲) and 100 μM (●), est ajouté 2 heures après inculturation bactérienne (2 répétitions).

Lorsque l'induction est réalisée en phase précoce de croissance bactérienne (0,1A à 600 nm), parmi les concentrations d'inducteur testées (0,5, 5, 50 et 100 μM), la plus forte activité β-galactosidase, 747 mU, a été obtenue par l'ajout de 5 μM d'apigénine (Fig. 28). Une activité de 443 mU a été observée pour une induction par 50 μM d'apigénine, alors ce niveau d'induction est quasi nul pour la concentration 100 μM révélant ainsi une potentielle toxicité de l'inducteur lorsque celui-ci est présent en trop forte concentration.

Par ailleurs, pour chaque traitement, le maximum d'activité est proche de 30 h après induction, suivie d'une diminution progressive de l'activité (étude réalisée jusqu'à 104 h après induction).

III.2. Conclusions intermédiaires

Il existe une plage de temps étroite pour une induction optimale prenant en compte à la fois la concentration en inducteur, la densité bactérienne lors de l'ajout de l'inducteur et le temps d'induction.

Nous avons déterminé que la concentration optimale en inducteur est de 5 μM et que le délai de l'ajout de ce dernier doit intervenir lorsque la densité bactérienne atteint 0,1A à 600 nm soit en phase précoce de croissance juste avant la phase exponentielle.

En appliquant ces conditions, nous avons pu optimiser la possibilité de produire de facteurs Nod.

IV. Article 2 : « Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T : a classic process for an atypical symbiont »

Cet article a été soumis dans le journal « Soil Biology and Biochemistry ».

Adeline Renier¹, Philippe Jourand¹, Sylvie Rapior², Véréna Poinso³, Abdoulaye Sy¹, Bernard Dreyfus¹ and Lionel Moulin^{1*}

¹Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SupAgro/UMII, TA A82/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France.

²Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, UMR 5175 CEFV, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1, 15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France.

³Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR 5623 CNRS / Université Paul Sabatier, 31 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

IV.1. Abstract

Some legume species of the *Crotalaria* genus are specifically nodulated by methylotrophic remarkable bacteria belonging to the *Methylobacterium nodulans* species. The feature of this symbiotic bacterium is its ability to oxidize methanol, a property based on the presence of a methanol dehydrogenase enzyme. Despite a good knowledge of this property and its implication in symbiosis, the molecular dialogue between *M. nodulans* and *C. podocarpa* leading to symbiosis is largely unknown, except the presence of a *nodA* nodulation gene in the genome of *M. nodulans* ORS 2060. To investigate if *M. nodulans* ORS2060 produces Nod factors, molecules considered as the major bacteria-to-plant signals essential for the establishment of rhizobia-legume symbiosis, we identified and sequenced a *nodDABCUIJHQ* cluster from a genomic library of ORS2060. Phylogenetic analyses of *nod* genes revealed that *M. nodulans* ORS2060 form a branch together with *Burkholderia tuberum* STM678 and a strain of *Methylobacterium* sp. (4-46) isolated from *Lotononis*, and distinct from all the other rhizobia. To analyse the regulation of ORS2060 *nod* genes, we constructed a *nodA-LacZ* promoter fusion to monitor the *nod* gene expression with various flavonoids. The flavone apigenin was found to be the strongest inducer of *nod* genes expression in *M.*

nodulans ORS 2060. This latter flavonoid was used to induce ORS2060, and Nod factors were purified by HPLC and further characterised by mass spectrometry. One major Nod factor structure was identified as a pentamer of chitin substituted by C18:1- or C16:0 acyl chains on the non-reducing end and 6-O-sulfated on the other end, suggesting a classic symbiotic dialogue between *M. nodulans* and *Crotalaria podocarpa*.

IV.2. Introduction

The symbiosis between rhizobia and legumes result in the formation of N₂ fixing root nodules and has been described as a multi-step process mediated by signal molecules produced by both bacteria and plants (Spaink, 1992). The first apparent exchange of signals involves the secretion of phenolic compounds by legumes such as flavonoids and isoflavonoids (Peters & Verma, 1990). These polyphenolic compounds induce the transcription of bacterial nodulation genes leading to the biosynthesis of a bacterial signal, the nodulation (Nod) factor (Peters & Verma, 1990; Dénarié et al., 1996). Nod factors metabolites are lipo-chito-oligosaccharides (LCOs), mostly an oligomeric backbone of three to five β -1,4-linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) residues with the N-acetyl group replaced by an acyl chain on the terminal non-reducing end (Perret et al., 2000; D'Haeze & Holsters, 2002). The structure of the fatty acyl chain, the number of GlcNAc residues and the presence of extra substituents determine the host-specificity of the bacterium (Dénarié & Cullimore, 1993; Dénarié et al., 1996). Nodulation genes can be classified into two categories: the common genes (*nodABCD*) are functionally conserved across rhizobia and involved in the formation of the N-acylated chitin oligomer Nod factor core; while specific *nod* genes (as *nodZ*, *nodH*, ...) encode enzymes involved in the synthesis and transfer of additional chemical compounds on the NF core, and are unequally distributed across rhizobia in relation to their host range (Downie, 1998).

Nod factors have been described as molecules participating in a various number of plant host physiological processes including cell divisions forming nodule primordia, activation of gene expression, root hair deformation, and oscillations in cytoplasmic calcium levels (termed calcium spiking) (Mitra et al., 2004; Kanamori et al., 2006).

The *Crotalaria* genus (Fabaceae family, Papilionoideae subfamily, Crotalarieae tribe) is composed of more than 600 species (Allen & Allen, 1981), located in the subtropical and

intertropical regions (Polhill & Raven, 1981). Some species have agronomic significance as green manure or for their nematicid properties (Silva et al., 1989). In Senegal, *Crotalaria* species have been found to be nodulated by *Bradyrhizobium* strains (Samba et al., 1999). Surprisingly, *Methylobacterium* spp. strains have been also isolated from root nodules of three Senegalese species of *Crotalaria*, *C. glaucoides*, *C. perrottetii* and *C. podocarpa* (Samba et al., 1999; Sy et al., 2001b). These symbiotic strains belong to a single species, named *Methylobacterium nodulans* for its ability to nodulate and fix nitrogen specifically during symbiosis with *Crotalaria* spp. (Jourand et al., 2004). Interestingly, the three species of *Crotalaria* associated with *Methylobacterium nodulans* are not nodulated by *Bradyrhizobium* sp. isolated from others species of *Crotalaria* (Samba et al., 1999, Sy et al., 2001b). If *Methylobacterium* strains have been found previously associated with plants at different levels, as epiphytes (Omer et al., 2004) and endophytes (Elbeltagy et al., 2000), this was the first description of a *Methylobacterium* species as a legume symbiont. Later, another group of symbiotic *Methylobacterium* strains has been isolated from various species of *Lotononis* in South Africa (*Lotononis angolensis*, *L. bainesii*, *L. listii*, *L. solitudinis*) (Jaftha et al., 2002, Yates et al., 2007), which belong to a close species of *M. nodulans* (Yates et al., 2007). However, cross inoculation studies showed that *M. nodulans* does not form nodules on *Lotononis* species (Yates et al., 2007).

Specificity of the *Methylobacterium-Crotalaria* interaction has been already assessed by an evaluation of the role of the methylotrophic properties on the symbiotic process. Inoculation of *Crotalaria podocarpa* species with methylotrophic minus mutants resulted in a reduction of the nodule number and a drastic decrease of plant biomass (Jourand et al., 2005). However, no investigation has been carried out to determine which signal molecules are involved in the molecular dialogue between *M. nodulans* and its host plant. Previous genetic studies revealed the presence of the *nodA* nodulation gene in the type strain of *Methylobacterium nodulans* (ORS 2060), suggesting that this bacteria may produce also the symbiotic LCOs (Sy et al., 2001a; Jourand et al., 2004).

The aim of this study was to determine which signal molecules are involved in the symbiosis between *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 and *Crotalaria podocarpa*, by the characterization of the bacterial nodulation genes cluster, identification of the flavonoids that induce their expression, and finally determination of the Nod factors structures produced by the bacteria.

IV.3. Materials and methods

IV.3.1. Bacterial strains and cultures

Methylobacterium nodulans strains, belonging to the strain collection of the Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (Montpellier, France), were the wild-type strain ORS 2060 (Jourand et al., 2004) and the recombinant strain ORS 2060 *nodA-lacZ* (this study). All *M. nodulans* strains were grown in Yeast-Mannitol medium (Vincent, 1970) at 37°C. *Escherichia coli* strains pCM132, S17-1 and XL1-MR were provided by M. E. Lidstrom (Marx & Lidstrom, 2001), R. Simon (Simon et al., 1983) and A. Sy (Sy et al., 2001a), respectively. Standard methods were used for growth of *E. coli* in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook et al., 1989). All media were supplemented with appropriate antibiotics: nalidixic acid (100 µg ml⁻¹) for all *M. nodulans* strains, kanamycin (50 µg ml⁻¹) for *M. nodulans* ORS 2060*nodA-lacZ* and *E. coli* strains.

IV.3.2. Molecular techniques

Genomic DNA was prepared according to Chen and Kuo (1993). Plasmid and cosmid DNAs were isolated using Miniprep kits (Promega, Charbonnières, France). All reactions for DNA amplification by PCR or for sequencing as well as the methods for sequence analysis were carried out as previously described by Sy et al. (2001a). DNA amplified products were purified with a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Restriction endonuclease and ligase reactions were performed according to the manufacturer's specifications (Eurogentec, Angers, France). For Southern blot hybridization, restricted DNA was blotted to positively charged nylon membranes by the alkali transfer procedure and hybridized with digoxigenin (DIG)-dUTP using the DIG labelling kit supplied by Roche (Roche, Meylan, France).

The study of *M. nodulans* nodulation genes was performed using the ORS 2060 genomic library obtained by Sy et al. (2001a). Screening of *nodA*-containing cosmids was performed by DNA amplification using the primer pair *nodAf* brady (5'-GTY-CAG-TGG-AGS-STK-CGC-TGG-G-3') and *nodAr* brady (5'-TCA-CAR-CTC-KGG-CCC-GTT-CCG-3'). A selected clone, pSTM223, was confirmed by hybridization with a *nodA* probe constructed by DIG labelling of the ORS 2060 580-bp *nodA* internal fragment. A 7,13-kb XmaI fragment of pSTM223 containing the putative *nod* genes was subcloned in pUC18. This clone, called

pSTM520, was digested by *HindIII*, *SacI*, *SacII* and *BglII* and restriction fragments were cloned in pUC18 and sequenced using universal primer M13F (5'-GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-AC-3') and M13R-48 (5'-AGC-GGA-TAA-CAA-TTT-CAC-ACA-3'). Primer walk sequencing was performed to close the gaps of the pSTM520 insert. All sequences were performed using ABI chemistry on an ABI310 sequencer (Applied Biosystems).

IV.3.3. Construction of a ORS 2060 *nodA-LacZ* transcriptional fusion

A 366-bp DNA fragment of the *M. nodulans* ORS 2060 genome was amplified by PCR with primers pmNodA2060f (5'-GAA-TTC-GTT-TGC-GGC-CCC-TCA-TAA-TAA-ATA-GC-3') and pmNodA2060r (5'-CGA-AGA-TCT-GGA-CAG-CTC-TCC-TGT-TCC-GGA-GCT-3'), corresponding to the putative promoter section of *nodA* (GenBank accession AF220764). This 366-bp DNA fragment was cloned into the *EcoRI* and *BglII* sites of the pCM132 plasmid vector (Marx & Lidstrom, 2001). The combined pCM132-*nodA-lacZ* plasmid was transferred by electroporation into conjugative *E. coli* S17-1 and then into *M. nodulans* ORS 2060^T strain by conjugation. Conjugative colonies were selected on YM medium containing antibiotics (kanamycin at 50 µg ml⁻¹ and nalidix acid at 100 µg ml⁻¹).

IV.3.4. *Methylobacterium nodulans nodA* gene induction by flavonoids

The *M. nodulans nodA-LacZ* fusion was tested with flavones (apigenin, luteolin), flavonols (kaempferol, quercetin), and isoflavones (daidzein, genistein). All these chemicals were provided by Extrasynthese (Genay, France). The flavonoid standard solutions were prepared in ethanol (10 mM) and not as usual in methanol because of the methylotrophic property of the *Methylobacterium* strains. Cultures of *M. nodulans* ORS 2060 *nodA-lacZ* reaching an A₆₀₀ of 0.5 were supplemented with each signal compounds at 5 µM. For each treatment, β-galactosidase activity was recorded until 102 hours after induction using a specific protocol adapted from Miller (1972) for *Methylobacterium*. β-Galactosidase activity was measured on 20 ml aliquots of bacteria: cells were pelleted by centrifugation (10 min, 4000 rev min⁻¹), washed and resuspended in 1 ml of sterile water; then crushed by ultrasonication 2 times 1 min at 20 W (Sonics Material, Danbury, USA). After treatment, cell suspension was centrifuged 25 min at 14000 rev min⁻¹ and the crude supernatant was used to test both β-galactosidase activity (as described by Miller, 1972) and total soluble protein

content (using the Biorad Protein Kit, Biorad, Marnes la Coquette, France). The β -galactosidase activity was expressed in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of soluble proteins.

IV.3.5. Nod factor extraction and purification

Methylobacterium nodulans ORS 2060 was grown until the culture reached an A_{600} of 0.1. Then cells were induced to produce Nod factors by adding the best flavonoid inducer at 5 μM , and grown during 48 h at 37°C. Nods factors were extracted from filtered culture supernatants by partition with *n*-butanol (Roche et al., 1991). Purification was performed on a high-performance liquid chromatography system Waters 2690 separation module (Waters, Milford, Massachusetts, USA) with a semi-preparative C_{18} reverse phase column (10 mm x 250 mm; 5 μm , Phenomenex Gemini) using an isocratic solvent A (water-acetonitrile, 70:30 [vol/vol]) containing 50 mM ammonium acetate for 20 min, followed by a forty-minutes linear gradient from solvent A to solvent B (100% acetonitrile) containing 50 mM ammonium acetate at a flow rate of 1 ml min^{-1} . The UV absorption was monitored at 206 and 260 nm. Ammonium acetate and solvents from the collected fractions were removed by two successive freeze-dryings.

IV.3.6. Mass spectrometry

Each pre-purified HPLC fraction was analysed using a ESI-QqToF Ultima apparatus (Waters, Milford, Massachusetts, USA) using direct infusion. Spectra were recorded in both the positive and the negative mode. Peaks detected in the awaited range (m/z 1000-1500 for the simple charged species or 600-700 for the double charged ones) were submitted to MS/MS experiment to confirm their LCO nature.

Energies were the following: probe: 3 kV, cone: 100 V, Rf: 70 V, collision cell: 15 V for MS, 30 V for MS/MS. Collision gas: Argon. Direct inlet: solvent AcCN/ H_2O 1:1, 1% Acetic acid, rate: 10 $\mu\text{l min}^{-1}$. Concentrations were about 10^{-4} M.

IV.3.7. Phylogenetic analyses

The multiple nucleotide sequence alignments were generated using ClustalX (Thompson et al., 1997) and optimized manually. All phylogenetic analyses were performed using PAUP version 4.0b10 (Swofford, 1998). A partition of the *nodABCIJ* genes from

Methylobacterium ORS 2060 and 4-46 (genome available at JGI, <http://genome.jgi-psf.org/>) strains plus 9 strains (*Mesorhizobium loti* R7A (accession number AL672111) and MAFF303099 (NC_002678), *R. etli* CFN42 (NC_007761), *Sinorhizobium* sp. NGR234 (NC_000914), *S. meliloti* 1021 (NC_003037), *R. leguminosarum* 3841 (AM236084), *Burkholderia phymatum* STM815 (NZ_AAUG000000000), *B. japonicum* USDA110 (NC_004463) and *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 (L18897)) from which all these genes were available was constructed. Partition homogeneity tests were calculated between each marker partition, and homogeneity was found between all markers (P value = $1 - (704/1000) = 0.296$). A *nodA* ML phylogeny was also built, using 50 representative strains of the rhizobial diversity. The best-fit model for *nodA* selected by MODELTEST3.6 (Posada & Crandall, 1998) was the HKY+I+G model, with parameters Base=(0.1966 0.3043 0.3003), Nst=2, Tratio=1.6522, Rates=gamma, shape=1.2320 and Pinvar=0.2330.

For *nodABCIJ* and *nodA* phylogenies, bootstrapping analyses were performed using heuristic searches with 1000 and 100 replicates, respectively.

IV.4. Results

IV.4.1. Organization and analysis of nod genes in *Methylobacterium nodulans* ORS 2060

A 7,13-kb region of the pSTM223 cosmid (from a *M. nodulans* ORS 2060 genomic library constructed by Sy et al., 2001a), showing a positive hybridization signal to the *nodA* probe, was fully sequenced and analysed (see Materials and Methods for details). The full DNA sequence is available in GenBank under accession number AM712915, and annotation of the fragment is presented in Fig. SBB1.

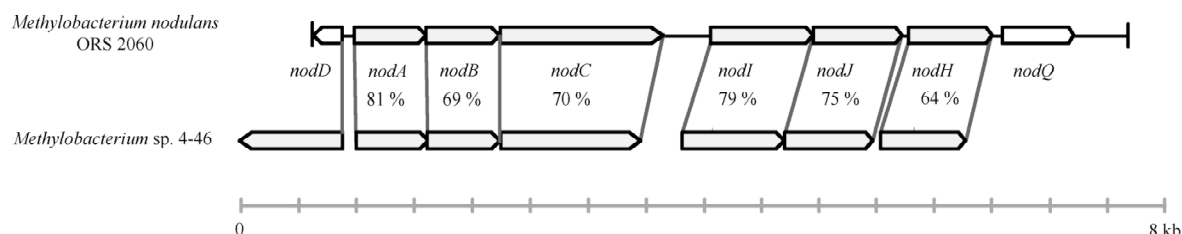


Figure SBB1. Comparison of nodulation genes operons in *Methylobacterium* sp. 4-46 (A) and *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (B).

% indicated are % of identities at the amino-acid level.

The analysis of the nucleotide sequence of the cosmid fragment revealed the presence of six open reading frames (ORFs). These ORFs showed high nucleotide sequence identity with known rhizobial nodulation genes. ORF₁ (215 amino acids) encodes a protein with 81% identity with NodA from *Burkholderia tuberum* STM678. ORF₂ (220 aa) presented 74% of identity with NodB from *Burkholderia* sp. STM 678 (CAC42488). ORF₃ (485 aa) showed 76% of identity with NodC from *Rhizobium* sp. N33 (AAB16897). ORF₄ (305 aa) revealed 81% of identity with NodI from *Sinorhizobium meliloti* 1021 (AAK65130). ORF₅ (264 aa) revealed 77% of identity with nodJ from *R. tropici* (CAC39129). The sixth ORF (250 aa) showed 71% of identity with NodH of *Rhizobium* sp. strain N33 (AAB16900). Upstream of these six ORFs, a 262 bp fragment similar to the 5'-end part of *nodD* (encoded on the reverse strand) is present but is interrupted by the end of the cosmid. In addition, an ORF with homology to the 3' end part of *nodQ* (56% identity with the 180 amino-acid long C-terminal part of *R. tropici* NodQ, Genbank accession number P52978), as well as relics of *nodU* and transposases were detected.

During the preparation of our article the complete genome of *Methylobacterium* sp. 4-46, a *Lotononis* symbiont, became available (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/met_4/). We thus included a comparison of both *nod* genes operons. Both strains exhibit a very similar organization of the *nod* cluster (see Fig. SBB1). The NodDABCIJ proteins share 69 to 81% identities between ORS 2060 and 4-46 strains (Fig. SBB1). In *Methylobacterium* sp. 4-46 genome, no additional *nod* gene was found (using blast searches of *B. japonicum* and *S. meliloti* *nod* gene sets).

A phylogenetical analysis of the *nodABCIJ* operon was then investigated using a partition of these 5 *nod* genes, and using a Maximum likelihood approach (see Materials and Methods). We included in the analysis all rhizobia from which all *nodABCIJ* genes have been previously sequenced (9 strains, see Fig. SBB2A). The tree obtained (Fig. SBB2A) shows that *M. nodulans* ORS 2060 form a distinct branch together with *Methylobacterium* sp. 4-46 supported by a high bootstrap (100%), though their sequences accumulated mutations since the speciation event.

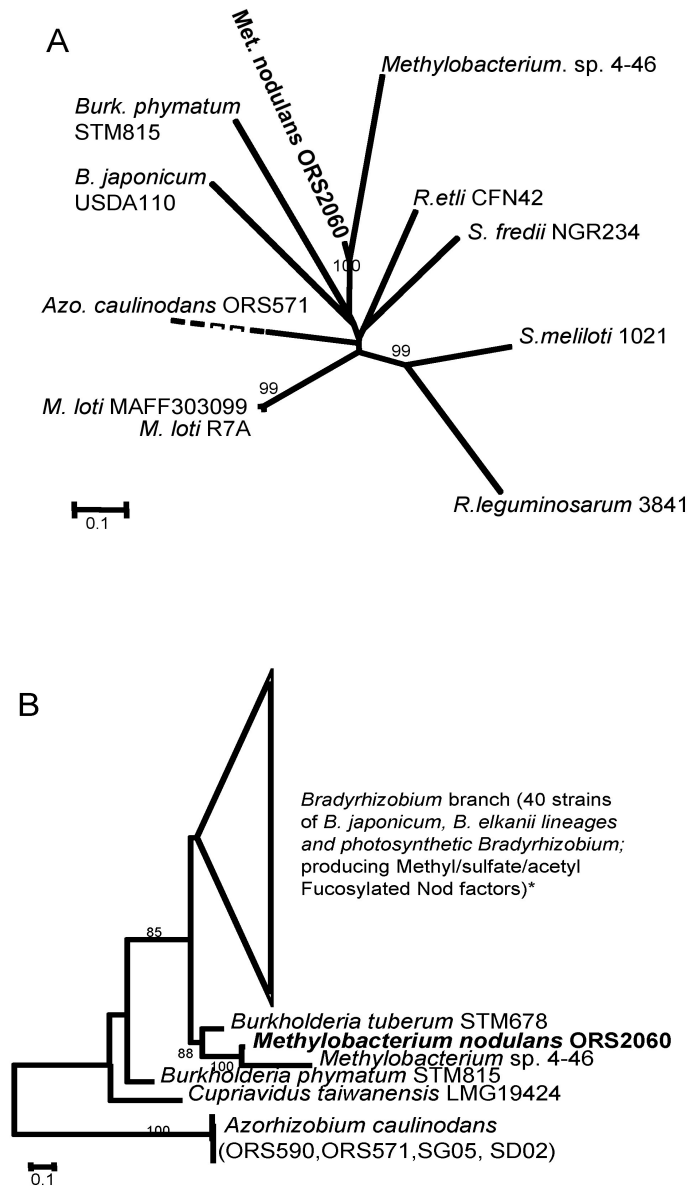


Figure SBB2. Maximum likelihood (ML) phylogenies of *nodABCII* concatenated alignments (A) and *nodA* gene (B).

Bootstraps indicated at tree nodes (when >50%) were calculated under ML criterion with 100 replicates. * *Bradyrhizobium* branch shown on Figure B includes 40 strains belonging to several *Bradyrhizobium* genomic species, for details see Fig. 2 of Moulin *et al.* (2004); Nod factor structure was deduced from structural studies and *nod* gene content. Abbreviations: *B.*: *Bradyrhizobium*, *Burk.*: *Burkholderia*, *S.*: *Sinorhizobium*, *R.*: *Rhizobium*, *M.*: *Mesorhizobium*, *Azo.*: *Azorhizobium*.

As the *nodA* gene has been previously used as a symbiotic marker of rhizobia (Moulin *et al.*, 2004, Stepkowski *et al.*, 2005), we also built a *nodA* phylogeny including 50 rhizobial strains representative of the rhizobial diversity (excepted *Sino-Meso-Rhizobium* strains, as they constitute separate *nodA* lineages from the *Methylobacterium-Bradyrhizobium* branch, Stepkowski *et al.*, 2007) to detect the closest phylogenetical symbiotic neighbours of

M. nodulans, presented in Fig. SBB2B. *Methylobacterium nodulans nodA* gene grouped strongly (100% bootstrap) with *Methylobacterium* sp. 4-46 and *Burkholderia tuberum* STM 678 (88% bootstrap), strains isolated from nodules of *Lotononis bainesii* and *Aspalathus carnosa*, respectively (Moulin *et al.*, 2001; Jafhta *et al.*, 2002).

IV.4.2. The expression of *nodA* is inducible by the flavone apigenin

We tested a number of commercially available flavonoids (chemical structure presented as Fig. SBB3) for their ability to induce the *nodA* promoter of *M. nodulans* ORS 2060.

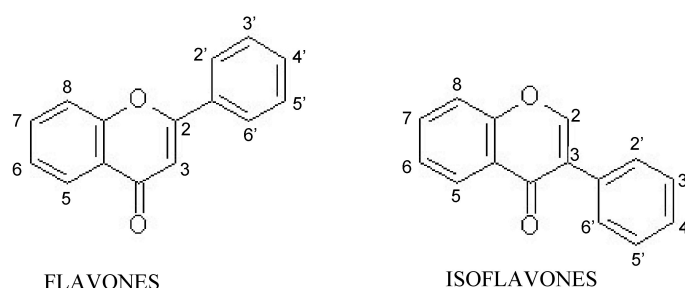


Figure SBB3. Flavonoid chemical structures.

In flavones the B ring is attached to C-2, while in isoflavones it is attached to C-3.

As shown in Table SBB1, addition of apigenin or kaempferol result in a high b-galactosidase activity of the *nodA-lacZ* promoter fusion and can thus be considered as strong *nod* gene inducers in strain ORS 2060. Their activities were not significantly different despite an additional C-3 hydroxylation of the kaempferol compared to apigenin. Luteoline (C-3'OH-apigenin) gave a b-galactosidase activity that was 3 fold lower as compared to apigenin. The flavonone quercetin (C-3'OH-kaempferol) did not give any detectable b-galactosidase activity (Table 1). Thus the presence of a hydroxyl on position C-3' of the flavonoid skeleton (as in luteolin or quercetin) reduces greatly the induction of *nod* genes expression.

The isoflavones differ from the flavones in that the B ring is attached to C-3 instead of C-2 (Fig. SBB3). As daidzein and genistein are not able to provoke a promoter response (Table SBB1), we conclude that the attachment of the B ring to C-2, as is found in flavones and flavonols, is of crucial importance for induction.

Table SBB1. Induction of the *Methylobacterium nodulans nodA* promoter by flavonoids*

Putative inducer	Hydroxylation pattern:					Maximal response (mU β-gal min ⁻¹ mg ⁻¹)
	3	5	7	3'	4'	
Flavones						
Apigenin	-	OH	OH	-	OH	654 ± 23 ^a
Luteolin	-	OH	OH	OH	OH	196 ± 6 ^b
Flavonols						
Kaempferol	OH	OH	OH	-	OH	616 ± 21 ^a
Quercetin	OH	OH	OH	OH	OH	1 ^c
Isoflavones						
Genistein	-	OH	OH	-	OH	0 ^c
Daidzein	-	-	OH	-	OH	0 ^c
Control**						0 ^c

^{a,b,c} Grouping is based on mean β -galactosidase activity and statistical results.

* Experiments were carried out as described in the text, with a induction time of 15 h.

** Control was induction medium without added inducers.

Data are means of two independent determinations

As apigenin was the most active inducer, this flavone was used to conditions to obtain a maximum expression of nod genes. Addition of 5 μ M apigenin to a *M. nodulans* culture reaching an A₆₀₀ of 0.1 led to the highest b-galactosidase activity and this condition was used to produce Nod factors.

IV.4.3. *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 produces pentameric LCOs 6-O sulphated at the reducing end

The Nod factors produced by *M. nodulans* were purified using standard protocol as described in Materials and Methods. Figure SBB4 shows the comparison of two HPLC profiles of Nod factors extraction from two different *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 cultures: the first one was obtained after induction with apigenin and showed the presence of putative LCO compounds (Fig. SBB4A), the second one was obtained without inducer (Fig. SBB4B). In absence of apigenin, no Nod factor could be detected on the HPLC profile (Fig. SBB4B). HPLC analysis revealed the presence of two chromatographic peaks absorbing at 1 206 nm, in the induced cultures (Fig.SBB 4A). Peaks were eluate at 57% and 65% acetonitrile, respectively.

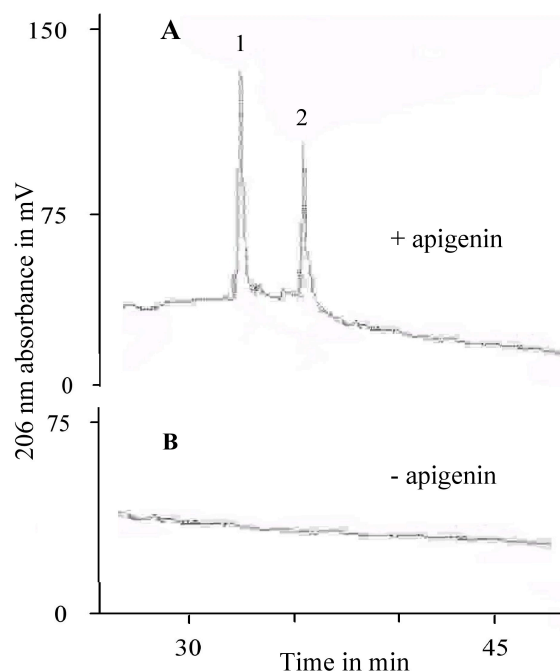


Figure SBB4. HPLC profiles of *n*-butanol extract induced with apigenin (A) or not induced (B) from *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 culture.

Separation was performed with the presence of ammonium acetate as described in Materials and Methods, with monitoring of the absorption at 206 nm.

Fractions corresponding to the two peaks detected in the HPLC profile were then collected and analyzed by ESI-MS. The positive ion spectra of compounds in fraction 1 exhibited a complex series of protonated $[M+H]^+$ (m/z 1336 with a minor m/z 1310) and alkali cationized molecules assigned to $[M + Na]^+$ (m/z 1358), $[M + K]^+$ (m/z 1374 and 1338, respectively) and $[M - H + 2Na]^+$ (m/z 1380) or $[M - H + Na + K]^+$ (m/z 1396 and 1370, respectively). Presence of such dialkali ions is characteristic of acidic functions. Samples were therefore submitted to a negative ionisation mode analysis. Only two compounds have been observed, the first very weak at m/z 1308 and the second intense at m/z 1334, allowing to attribute the molecular masses at M 1309 and 1335 Da. The mass difference between both is 26 amu indicating that the predominant one might exhibit a $C_{18:1}$ and the minor one a $C_{16:0}$ chain. Molecular masses obtained from the ESI-MS spectra are compatible with a chitopentamer substituted by a $C_{18:1}$ (or $C_{16:0}$) fatty acyl and a sulphate. Presence of this sulphate has been assessed by ionisation in the negative mode.

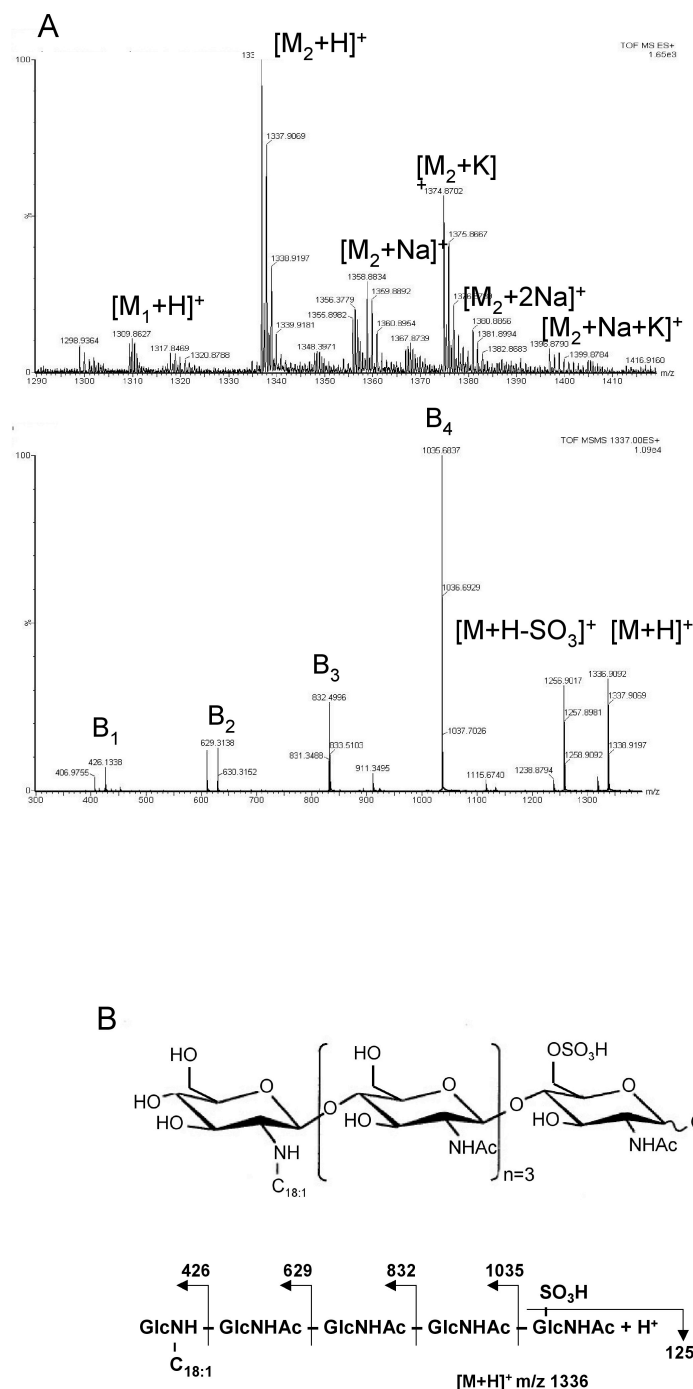


Figure SBB5. Results of the mass spectrometric analysis of the C_{18} high performance liquid chromatography fractions (A) and structure of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 Nod factor (B).

These structures have been confirmed through MS/MS experiments. Collision energy has been set to 30 V. A classical B fragmentation pattern has been observed, corresponding to disruption of the osidic junction between the glucosamines (Fig. SBB5A). This fragmentation produces a regular profile with mass differences of 203 amu between each ion corresponding to the GlcNAc subunits (221 amu for the reducing end). Fragmentation of the molecular ions

$[M+H]^+$ produced a loss of sulfite (SO_3) (80 amu) directly from the molecular species indicating that sulphation occurs on the reducing end. The profiles ended with B1 ions at m/z 407 and 426 respectively for the two Nod factors, indicating that the non reducing end is substituted only by a $C_{16:0}$ or mostly a $C_{18:1}$ acyl. From the MS/MS experiments, the structure presented in Fig. SBB5B can be deduced. Localisation of substitutions was deduced from already known NF structures. No Nod factor compounds were found in fraction 2.

IV.5. Discussion

Although most *Crotalaria* sp. are nodulated by non-methylotrophic *Bradyrhizobium* sp., few african species (*Crotalaria glaucoidea*, *C. perrottetii* and *C. podocarpa*) are found associated with bacterial symbionts belonging to the *M. nodulans* species (Samba et al., 1999; Sy et al., 2001b). In comparison to many other rhizobia, relatively little is known about the *M. nodulans* *nod* genes content and the symbiotic molecules involved in the molecular dialogue between the two partners. In this study, we show that the type strain ORS 2060 harbours a set of *nod* genes organized in a single operon with 6 ORFs (encoding NodA, NodB, NodC, NodI, NodJ and NodH proteins), as well as gene fragments of *nodD*, *nodU*, *nodQ* and of a transposase.

Methylobacterium nodulans harbours *nod* genes similar to the other rhizobia, although they constitute a separate cluster in the *nod* gene phylogenies together with *Methylobacterium* 4-46 (isolated from *Lotononis bainesii* (Norris, 1958) which genome has been recently sequenced at the Joint Genome Institute) and *Burkholderia tuberum* STM678 (isolated from *Aspalathus carnosa*, Moulin et al., 2001). As most *Methylobacterium* species are not symbiotic, it is highly probable that symbiotic abilities in this genus are not an ancestral character but have been acquired by lateral transfer. The presence of transposase relics close to the *nod* gene operon supports this idea. The host origin of the transfer remain unknown, as no close homolog of the *M. nodulans* *nod* genes have been characterized so far, except for *Burkholderia tuberum* that groups with the *Methylobacterium* branch with a high bootstrap value (98%) in the *nodA* tree. *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 and *Methylobacterium* sp. 4-46 are close species (97% 16S rDNA identity), with almost-identical *nod* genes organization and rather close *nod* gene sequences (Fig. SBB1). Thus the transfer of *nod* genes must have occurred in the ancestor of these two species, followed by vertical transmissions and coevolution of each species with their plant hosts, conducting to a high specificity

between the symbiotic partners *M. nodulans*/*Crotalaria* sp. and *Methylobacterium* sp./*Lotononis* sp. (*M. nodulans* does not nodulate *Lotononis* species, Yates et al., 2007).

Previous studies have shown that the *nodA* gene phylogeny was correlated to some Nod factor structural features (presence of additional fucose and/or arabinose on the nod factor backbone) produced by the bacteria, and to some extent to the host plant systematics (Debellé et al., 2001, Moulin et al., 2004). In the *nodA* tree, *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 groups together with *Burkholderia tuberum* (formerly *Bradyrhizobium aspalati*, Moulin et al., 2001) that produces unfucosylated Nod factors (Boone et al., 1999), and not with the *Bradyrhizobium* branch which strains produce NFs carrying a fucose (Fig. SBB2B, Moulin et al., 2004). It is also interesting to note that the host plant of the *Methylobacterium-Burkholderia* branch belong to the same *Crotalarieae* tribe (i.e. *Aspalathus*, *Crotalaria*, *Lotononis* species). This legume tribe may have a predisposition to form symbiosis with taxonomically uncommon rhizobia, and future diversity studies of *Crotalarieae* tribe genera symbionts would confirm or not this assumption.

A number of *nod* genes inducer compounds secreted from legume roots have been characterized so far. Most of these compounds belong to the flavonoid group, and share a common phenylpropanoid biosynthetic pathway. In order to purify and determine the chemical structure of LCOs produced by *Methylobacterium nodulans* during the symbiotic interaction with *Crotalaria podocarpa*, we tried to identify strong inducers of *nod* genes of *M. nodulans* ORS 2060 using a *lacZ* fusion in the promoter region of the *nodA* gene. We monitored the action of several known nod-gene inducers by following β -galactosidase activity. Apigenin was found to be one of the most powerful. This result is consistent with the identification of apigenin 7-*O*- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside in the aerial parts of *Crotalaria podocarpa* (Wanjala & Majinda, 1999). Apigenin is thus likely the natural inducer of *M. nodulans nod* genes in the rhizosphere.

Isoflavonoids (as genistein) have been shown to be common inducers of *Bradyrhizobium nod* genes (Gillette & Elkan, 1996; Zhang et al., 1996; Souleimanov et al., 2002). In this study, we found that *M. nodulans* ORS 2060 *nod* genes are not induced by this flavonoid subfamily. This first level of specificity between rhizobia and legumes could explain the host range and cross inoculation results reported by Yates et al. (2007).

Nod factor metabolites trigger the formation of nodules on legume roots (Dénarié *et al.*, 1996). These compounds harbour various substitutions differing between rhizobia and related to their host specificity. The Nod factor produced by *M. nodulans* is a pentamer of chitin carrying a sulfate on the reducing glucosamine residue and substituted by fatty acids, either vaccenic acid (C_{18:1}) or palmitic acid (C_{16:0}), on the non-reducing glucosamine residue. This Nod factor can be considered as having a simple structure compared to rhizobial NFs reported so far (around 60 strains have been characterized for their NFs structure). Such kind of structure has only been reported as a minor part of the NF mixture produced by *R. tropici* CIAT899, the major part being NFs with additional mannose on the reducing end and various fatty acyl chains (Folch-Mallol *et al.*, 1996). Several rhizobial strains produce sulfated NFs as intermediates of NF biosynthesis, the final product carrying always additional substitutions on the NF backbone, such as fucose, arabinose, methyl or carbamoyl (D'Haeze & Holsters, 2002). The symbiosis between *Methylobacterium* and its plant host is specific, since *Bradyrhizobium* isolated from other species of *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* and *C. retusa*) do not nodulate the 3 African species nodulated by *Methylobacterium* (Samba *et al.*, 1999, Sy *et al.*, 2001b). Even the broad host range rhizobium NGR234, nodulating more than 350 species of legumes (Pueppke & Broughton, 1999) and producing a complex mixture of NFs (Jabbouri *et al.*, 1995), do not nodulate *Crotalaria podocarpa* (data not shown). The *Bradyrhizobium* isolated from *Crotalaria* species should produce fucosylated Nod factors (like all *Bradyrhizobium* NFs described so far), as Moulin *et al.* (2004) reported the presence of *nodZ* (encoding NF fucosyl transferase) in the genomes of several *Crotalaria*-isolated strains.

Crotalaria symbionts described so far thus seem to belong to two inoculation groups: most of *Crotalaria* species are nodulated by slow growing *Bradyrhizobium* that may produce a mixture of fucosylated NFs, while the 3 species *C. podocarpa*, *C. glaucoides* and *C. perrottetti* are specifically nodulated by *Methylobacterium nodulans* producing a simple Nod factor structure, sulphated on the reducing end. Specificity of this model may be present at two steps of the interaction: first the nature of the flavonoid *nod* gene inducer, being apigenin for *Methylobacterium* and not genistein, a common inducer of *Bradyrhizobium nod* genes; and second at the NF structure level since *Crotalaria podocarpa* seems to discriminate between sulphated and fucosylated NFs. This symbiotic molecular dialogue appears thus classic likewise the other rhizobia. *Methylobacterium* is an uncommon genus among symbiotic nitrogen-fixers, and occurrence of symbiosis in this genus may be the result of a

more complex interaction, via specific adaptations of bacterial species to the *Crotalaria podocarpa* rhizosphere, these legumes being known to produce alkaloids (Arzt & Mount, 1999). The complete genome sequencing of *M. nodulans* ORS 2060 (underway at the Joint Genome Institute in 2007) will surely enhance our understanding of the intimate symbiosis between *Methylobacterium* and *Crotalaria*.

Acknowledgements

The authors thank Jean Dénarié and Fabienne Maillet for their help and technical support on Nod factor extraction and Eric Giraud and Nico Nouwen for critical comments on the manuscript.

Remarque : les références bibliographiques citées dans l'article sont incluses dans la bibliographie finale du manuscrit.

V. Discussion générale

La formation des nodules racinaires met en jeu un dialogue moléculaire complexe entre la plante-hôte et les rhizobia. La plante sécrète des signaux principalement de type flavonoïdes. La perception de ces signaux par la bactérie induit l'expression de nombreux gènes bactériens dont les plus étudiés sont les gènes *nod*. Dans notre étude, nous avons montré que la symbiose entre la bactérie méthylotrophe *M. nodulans* et la légumineuse tropicale *C. podocarpa* suit également ce modèle.

En effet, nous avons pu prouver que l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* possède la capacité d'induire l'expression du gène *nodA* de *M. nodulans*. Par ailleurs, la présence de flavonoïdes de type flavone a été démontrée par une étude par CCM de l'exsudat racinaire. L'analyse de cet exsudat par CLHP, a ensuite révélé la présence de composés présentant des caractéristiques spectrales proches de l'apigénine-7-O-glucoside. Par ailleurs, l'identification de l'apigénine 7-O- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside a été isolé des parties aériennes de *C. podocarpa* renforce ces résultats (Wanjala & Majinda, 1999).

Ceci suggère donc que les flavonoïdes majoritairement présents dans l'exsudat seraient proches d'une forme d'apigénine liée à un sucre plus complexe que le glucose en position 7. Néanmoins, la nature exacte des flavonoïdes contenus dans cet exsudat racinaire de *C. podocarpa* reste à élucider.

Il est à signaler que l'induction du gène *nodA* par l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* est moins importante que celle initiée par des flavonoïdes exogènes tel que l'apigénine, ceci probablement dû à une différence de concentration des composés testés. Néanmoins, il apparaît clairement que la structure des flavonoïdes inducteurs testés est cruciale quant à la réussite ou non de l'induction. Cette piste d'étude sera approfondie dans le chapitre suivant.

L'existence du signal bactérie-plante a également été prospectée. Nous avons pu identifier une structure de facteur Nod, pentamère de résidus N-glucosamine substitué par un sulfate à l'extrémité réductrice et par la possibilité de deux acides gras différents, l'acide vaccénique (C_{18:1}) ou l'acide palmitique (C_{16:0}) respectivement en proportion 10 pour 1, à l'extrémité non réductrice. Néanmoins, la production de ce facteur Nod a été réalisée par induction de la souche bactérienne avec un flavonoïde exogène, l'apigénine, et non par l'exsudat racinaire. Du fait de la complexité à la fois du contenu potentiel de l'exsudat racinaire, du pouvoir

inducteur ou inhibiteur de chacun des flavonoïdes putativement présents et de la présence d'autres gènes nod potentiellement présents mais non identifiés chez *M. nodulans*, on ne peut exclure l'existence d'autres structures de facteurs Nod.

Par ailleurs, il existe de nombreux cas référencés où plusieurs copies du gène *nodD* sont retrouvées dans le génome du partenaire bactérien et ce, quelque que soit le genre auquel celui-ci appartient : *Sinorhizobium* (Peck et al., 2006) *Rhizobium* (Davis & Johnston, 1990), ou bien encore *Bradyrhizobium* (Gillette & Elkan, 1996). A titre d'exemple, la petite portion de séquence du gène *nodD* identifié chez *M. nodulans* (partie 3' terminale) présente 78% d'identité avec le gène *nodD1* de *Sinorhizobium* sp. BR816 isolée de *Leucaena leucocephala*. Ce rhizobium contient 4 gènes *nodD*, dont les protéines issues de leur transcription diffèrent dans leurs interactions avec les flavonoïdes (Van Rhijn et al., 1994).

L'induction des gènes de nodulation sous contrôle de la protéine NodD apparaît donc flavonoïde dépendante. On ne peut alors exclure l'existence d'autres structures de facteurs Nod, flavonoïdes inducteurs-dépendantes, suivant les gènes de nodulation spécifiques activés.

CHAPITRE III

SPÉCIFICITÉ DE SYMBIOSE

I. Introduction

L'une des propriétés majeures de la symbiose rhizobium-Légumineuse est sa spécificité. En effet, un rhizobium donné n'est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote qu'avec un nombre limité d'espèces végétales, défini par son spectre d'hôtes. Inversement, une espèce de légumineuse donnée ne pourra établir une association symbiotique qu'avec une ou plusieurs espèces ou genres de rhizobia, définissant ainsi le spectre d'hôtes de la Légumineuse (Fisher & Long, 1992).

Comme nous l'avons vu, la nodulation commence par un échange de signaux entre les deux partenaires symbiotiques. Ceci est principalement initié par des composés de type flavonoïdes exsudés par les racines de la plante (Peters *et al.*, 1986). La reconnaissance par le partenaire bactérien de ce signal flavonoïde spécifique produit par une légumineuse hôte, induisant la biosynthèse de facteurs de nodulation, est la première étape clé dans la détermination de la spécificité d'hôtes (Fisher & Long, 1992).

Sur la racine de la plante-hôte, le signal facteur Nod induit une série de réponses physiologiques et développementales menant à la formation d'une nodosité fonctionnelle. La reconnaissance du facteur Nod par la plante-hôte représente le second niveau de spécificité.

Toutefois, ces deux niveaux de spécificité sont parfois insuffisants pour expliquer un spectre d'hôtes particulier, et d'autres facteurs influent sur l'établissement de la symbiose, à la fois pendant l'infection (avec le rôle des exopolysaccharides) mais surtout au cours des étapes plus tardives de la symbiose (Broughton & Perret, 1999 ; Spaink, 2000 ; Stougaard, 2000).

Pendant longtemps, les Légumineuses du genre *Crotalaria* ont été considérées comme des Légumineuses classiques, formant une association symbiotique avec les *Bradyrhizobium* du groupe « cowpea » (Wilson 1939, 1944). En 2001, les travaux de Sy *et al.* (2001a et b), portant sur les propriétés symbiotiques (fixation de l'azote et spécificité d'hôtes) d'une collection de souches de différentes espèces de *Crotalaria* poussant au Sénégal, ont montré que certaines espèces de *Crotalaria* ont une forte spécificité de nodulation, et ne forment pas de symbiose avec les *Bradyrhizobium*. En effet, les trois espèces de crotalaires, *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa*, nodulaient et fixaient l'azote exclusivement lorsqu'elles sont en symbiose avec des souches à croissance rapide. Le séquençage de l'ADNr 16S de ces

souches, a révélé des séquences identiques confirmant l'homogénéité du groupe. Ces souches appartenaient au genre *Methylobacterium*, constituant ainsi une nouvelle branche phylogénétique de rhizobia. Puis les travaux de Jourand et *al.* (2004a) ont décrit ces souches comme une nouvelle espèce, *Methylobacterium nodulans*.

Pourquoi et comment une telle association s'est mise en place est une énigme, même si différentes hypothèses ont déjà été soulevées (Jourand, 2003 ; Jourand et *al.*, 2004a).

On peut ainsi se demander si l'association de type symbiose fixatrice d'azote *M. nodulans* – *Crotalaria* sp. résulte d'une adaptation de la bactérie à son milieu et/ou d'une évolution génétique de cette espèce de *Methylobacterium* qui aurait acquis les gènes de nodulation.

Une première hypothèse est donc que l'association *M. nodulans* – *Crotalaria* sp. serait le reflet d'une adaptation de la bactérie à la rhizosphère de la plante. Les *Methylobacterium* sont en effet des bactéries résistantes à de nombreux produits toxiques et capables de dégrader des substrats complexes comme les composés aromatiques volatils issus des gaz d'échappement des véhicules (Green, 1992). Comme les crotalaires sont des plantes productrices de composés toxiques complexes, notamment d'alcaloïdes de type pyrrolizidinique (Polhill, 1982), il est possible que l'association symbiotique *M. nodulans* – *Crotalaria* sp. résulte d'une adaptation de la bactérie à la plante. *Methylobacterium nodulans* pourrait dégrader les alcaloïdes de type pyrrolizidinique ou tout du moins de résister à leur toxicité ce qui lui conférerait un avantage par rapport aux autres bactéries nodulantes de la rhizosphère.

La seconde hypothèse serait que la sélection au lieu au niveau de l'interaction plante-bactérie : si la plante ne produit pas la bonne molécule inductrice des gènes nod qui va interagir avec la protéine NodD, alors le processus de nodulation ne se met pas en place. Ce peut être le cas pour *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa* vis-à-vis des *Bradyrhizobium*. A l'inverse, il existe peut-être une ou des molécules spécifiques produites par ces trois espèces de crotalaires, susceptible(s) d'induire les gènes de nodulation de *Methylobacterium* et non ceux des *Bradyrhizobium*.

Pour initier des pistes de réponses à la question « comment cette symbiose originale, du fait du caractère singulier des deux partenaires - une légumineuse aux propriétés toxiques et une bactérie méthylotrophe – a pu se mettre une place ? », nous avons tout d'abord vérifié la toxicité potentielle de l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* sur les bactéries habituellement

rencontrées en symbiose avec les crotalaires. En complément, nous avons étudié la composition chimique de l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* en présence ou non du partenaire bactérien, *M. nodulans*.

Ayant pris en compte l'importance des conditions d'induction (concentration de l'inducteur, délai et durée de l'induction) dans le chapitre précédent, nous nous sommes alors intéressés à l'importance des caractéristiques structurales des flavonoïdes inducteurs des gènes nod chez *M. nodulans*.

Enfin, sur la base des travaux de Sy et *al.* (2001a), nous avons réalisé des tests de nodulation sur 10 espèces, en les complétant par une étude par chromatographie liquide haute performance des exsudats racinaires de 7 d'entre-elles, à la recherche de « la » molécule de spécificité.

II. Etude complémentaire des exsudats racinaires de *Crotalaria podocarpa*

Nous avons testé d'une part, l'influence de l'exsudat racinaire sur la croissance bactérienne et d'autre part, l'influence de la bactérie sur le contenu des exsudats racinaires.

II.1. Toxicité de l'exsudat racinaire de *C. podocarpa*

Pour tester l'hypothèse de la toxicité de l'exsudat racinaire envers les bactéries de la rhizosphère et notamment les bactéries du genre *Bradyrhizobium*, nous avons suivi le comportement de deux cultures bactériennes, *M. nodulans* ORS 2060 et *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810, en présence ou non d'exsudat racinaire de *C. podocarpa* dans le milieu de culture. Un millilitre d'échantillon d'exsudat racinaire (à $7,3 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) ou d'eau stérile (témoin négatif) a donc été ajouté à chacune des cultures bactériennes. Les densités optiques de ces dernières ont été suivies jusqu'à 144 h après inoculation (données non présentées).

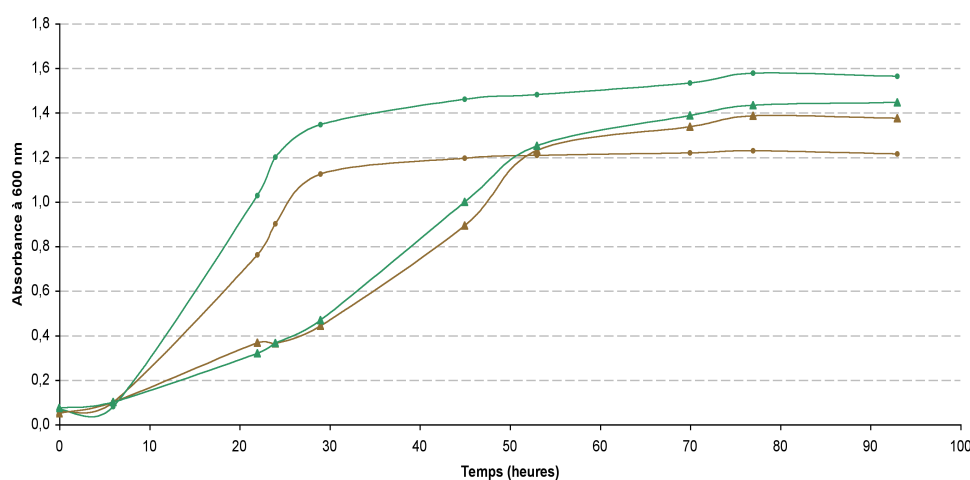


Figure 29. Effets des exsudats racinaires de *Crotalaria podocarpa* sur la croissance de *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (●) et de *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 (▲).

Les cultures bactériennes ont été réalisées en milieu YM non complémente (en marron) ou en milieu YM complémente avec l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* (en vert). 2 répétitions.

Comme attendue, une différence marquée des vitesses de croissance des souches bactériennes a été constatée (Fig. 29). La souche à croissance rapide, *M. nodulans* ORS 2060, atteint une densité bactérienne maximale (représentée par le début de la phase plateau de la cinétique) environ 30 à 40 h après inoculation, tandis que la souche à croissance lente, *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810, atteint cet état environ 70 h après inoculation.

Les cinétiques de croissance de la souche *M. nodulans* révèlent une augmentation de la densité de la culture bactérienne lorsque celle-ci est réalisée en milieu complémenté par l'exsudat racinaire de *C. podocarpa*. A un temps de croissance donné, l'état physiologique de la culture reste inchangé, mais l'absorbance, mesurée à 600 nm, est supérieure d'environ 0,2 à 0,3 A au point d'inflexion et de plus de 0,4 A en phase plateau.

En revanche, aucune différence significative sur la cinétique de croissance de *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 a été observée entre le témoin négatif, milieu riche YM non complémenté, et ce même milieu de culture complémenté avec l'exsudat racinaire de *C. podocarpa*.

II.2. Influence de *M. nodulans* dans la rhizosphère de *C. podocarpa*

Du fait que la présence d'exsudat racinaire de *C. podocarpa* influence la densité bactérienne, nous avons envisagé la situation inverse à savoir l'influence de la bactérie, dans la rhizosphère de la plante, sur le contenu des exsudats racinaires. Ainsi, la possibilité que la plante détecterait la présence d'une bactérie spécifique dans sa rhizosphère et produirait en retour un composé inducteur particulier, notamment de *M. nodulans*, a donc été envisagée.

Nous avons recueilli des exsudats racinaires de 4, 8 et 12 jours après germination sur des lots de plantes inoculées ou non avec *M. nodulans* ORS 2060. Ces exsudats, une fois traités, ont été analysés par CLHP (Fig. 30). A la longueur d'onde de 325 nm, aucune différence majeure n'est constatée entre les chromatogrammes HPLC obtenus avec les exsudats racinaires de *C. podocarpa* inoculé et non inoculé âgés de 4 jours après germination (Fig. 30A). Sur la base des pics définis chapitre 2, II.1.4.2. (Tableau V, Fig. 26), on retrouve les pics PO1 (TR = 40,89 min) et PO2 (TR = 43,22 min). On observe toutefois une absorbance du pic PO2 légèrement plus importante pour l'exsudat racinaire inoculé que pour l'exsudat non inoculé. A 8 jours, le contenu des exsudats racinaires apparaît identique mais des différences quantitatives marquées sont observées sur l'ensemble des pics des chromatogrammes (Fig. 30B) : les absorbances pour les pics déterminés pour les exsudats non inoculés étant environ de moitié celles pour les exsudats inoculés. Enfin, à 12 jours, on constate une augmentation généralisée des différents pics révélant une accumulation progressive des exsudats racinaires au sein du milieu de culture des plantes (Fig. 30C). On note également, comme à 8 jours, une différence quantitative entre les exsudats inoculé ou non inoculé, néanmoins les absorbances des pics déterminés pour l'exsudat non inoculé représentent ici environ deux tiers celles de l'exsudat inoculé.

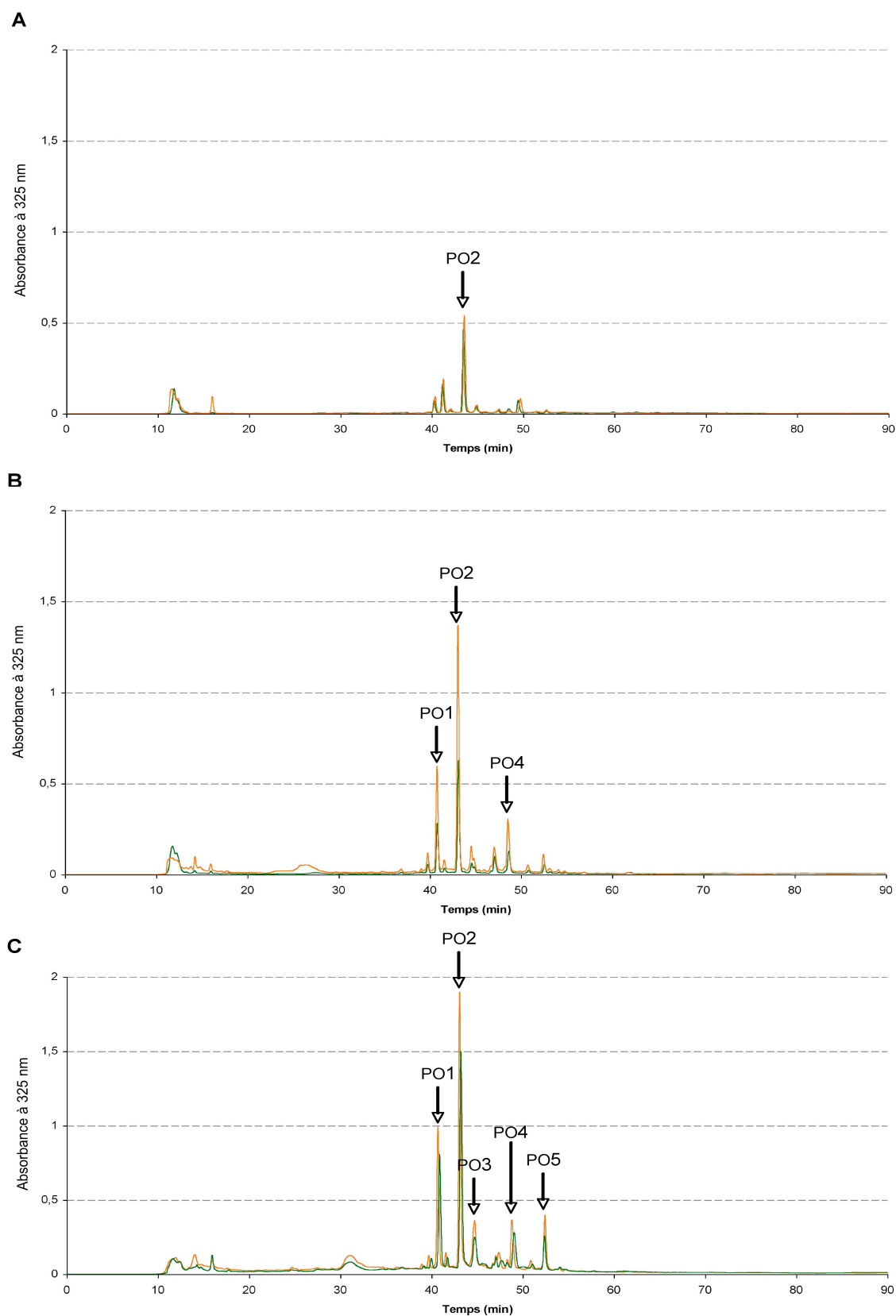


Figure 30. Chromatogramme CLHP des exsudats racinaires de *C. podocarpa* ($\lambda = 325$ nm).
 Les exsudats ont été recueillis 4 jours (A), 8 jours (B) et 12 jours (C) après germination. Les plantes ont été inoculées (orange) ou non inoculées (vert) par *M. nodulans* après germination.

Hormis les 5 pics préalablement définis (PO1 à PO5), révélant la présence de 5 composés de façon constante dans les exsudats racinaires de *C. podocarpa*, que la bactérie soit présente ou non dans la rhizosphère de la plante, les quantités des autres composés détectés sont faibles. L'analyse CLHP a donc été ensuite visualisée avec des chromatogrammes présentant en axe des ordonnées les λ maximales, et non une absorbance à une longueur d'onde fixe (Fig. 31).

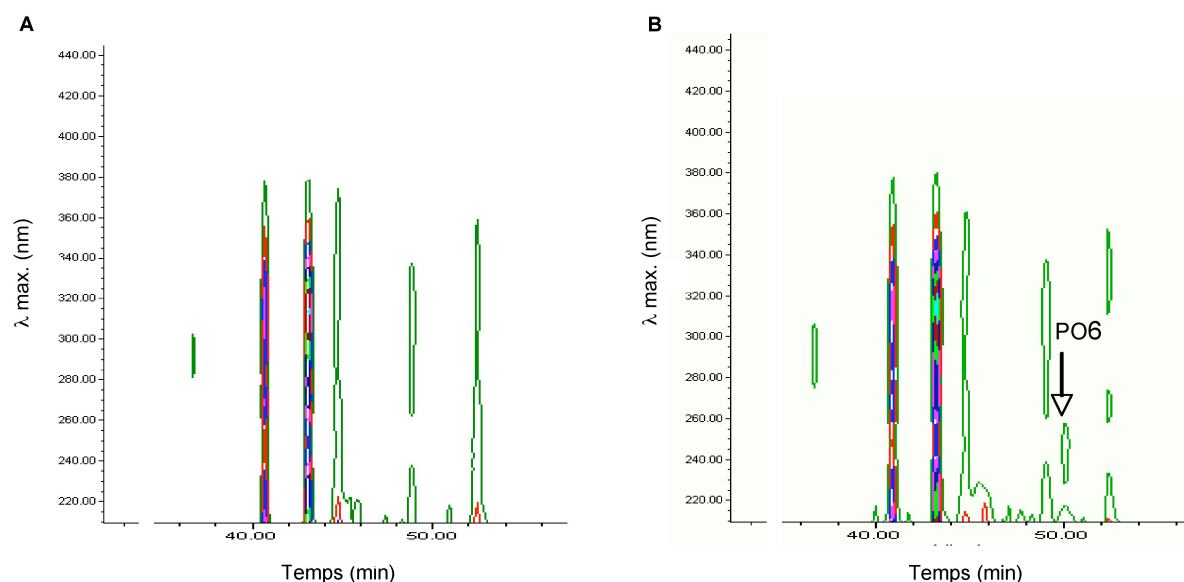


Figure 31. Chromatogramme CLHP des exsudats racinaires de *C. podocarpa* ($200\text{ nm} < \lambda < 400\text{ nm}$).

A : exsudat racinaire de *C. podocarpa* (12 jours) non inoculé. B : exsudat racinaire de *C. podocarpa* (12 jours) inoculé avec *M. nodulans*. Flèche rouge : composé supplémentaire.

En se focalisant dans une zone comprenant les temps de rétention (entre 35 et 45 min) et λ maximales (entre 200 et 400 nm) connues des flavonoïdes, un nouveau composé est détecté au temps de rétention 50,08 min, dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* inoculé par *M. nodulans*, 12 jours après germination (Fig. 31B, flèche) par rapport à l'exsudat non inoculé (Fig. 31A).

Le spectre UV de ce composé supplémentaire, nommé PO6, révèle des λ maximales de 235sh, 247,3, 260sh et 299,5 nm (Fig. 32A).

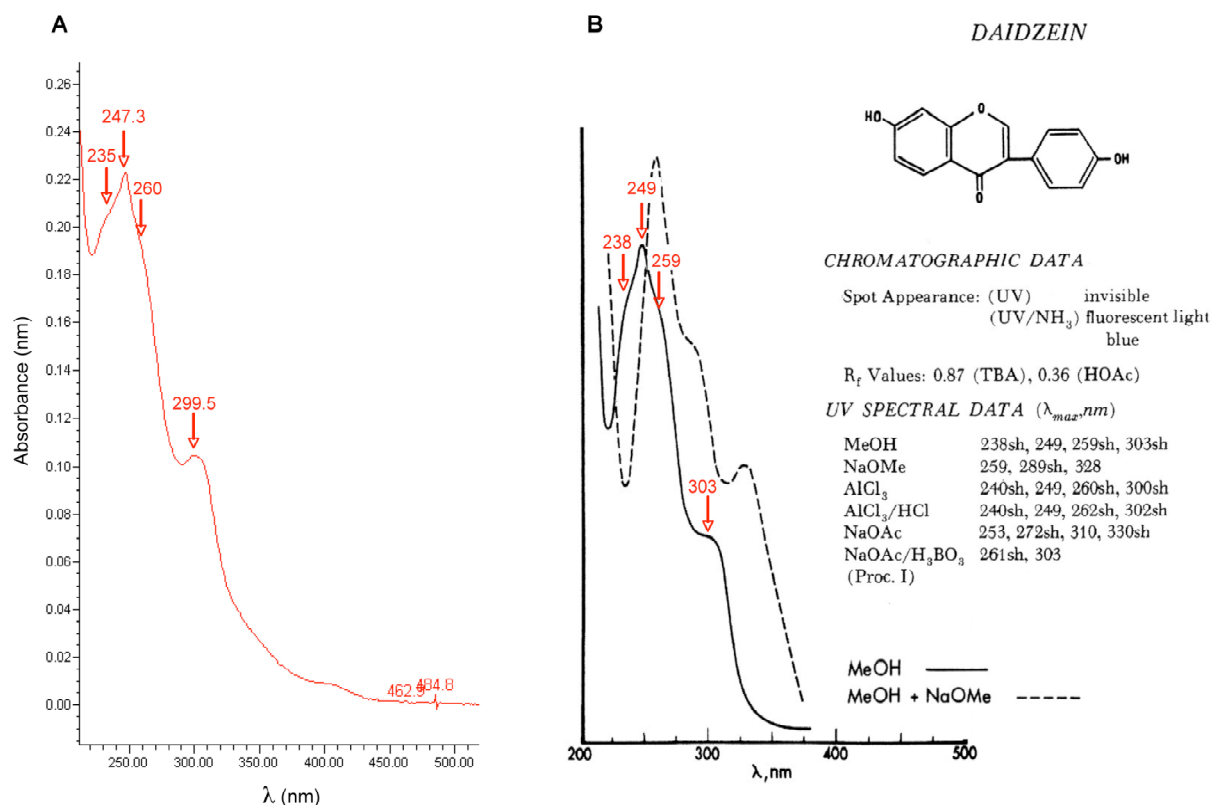


Figure 32. Spectres UV du composé PO6 et de la daidzéine.

A : composé supplémentaire PO6. B : Daidzéine (issue de Mabry et *al.*, 1970).

La comparaison du spectre UV du composé PO6 avec les données de la littérature, le rapproche de la daidzéine (λ_{max} 238sh, 249, 259sh, 303sh nm) (Fig 32B, Mabry et *al.*, 1970).

II.3. Conclusions intermédiaires

L'hypothèse de la toxicité des exsudats racinaires de *C. podocarpa* envers les bactéries du genre *Bradyrhizobium* n'est pas recevable car aucune modification de la croissance de *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 n'a été observée lorsque ces bactéries sont mises en présence de ces exsudats. En revanche une augmentation de la densité bactérienne de *M. nodulans* en présence de ces derniers est constatée. La cinétique de croissance est « chronologiquement » identique mais la densité bactérienne, à un temps donné, est plus importante, reflétant plus une augmentation des capacités de métabolisation (milieu plus riche) qu'une stimulation de croissance (avancée dans le temps). Ceci pourrait présenter un avantage sélectif pour *M. nodulans* par rapport aux autres bactéries présentes dans la rhizosphère puisque qu'il a été montré que l'expression des gènes nod est dépendante de la densité bactérienne (Loh et *al.*, 2002).

Par ailleurs, nous avons démontré que l'exsudation des composés flavonoïdiques est progressive dans le temps. Une différence quantitative marquée, des 5 composés préalablement identifiés (PO1 à PO5), entre les exsudats non inoculé et inoculé de *C. podocarpa* a été démontrée. Cette différence apparaît la plus importante à 8 jours puis la différence en termes de quantité de composés exsudés semble s'amoindrir. Douze jours après germination, un composé supplémentaire, PO6, possédant une signature spectrale très proche de la daidzéine, dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* inoculé avec *M. nodulans* est détecté. Néanmoins, il semble difficile de conclure entre, d'une part, la possibilité d'un réel composé supplémentaire, induit par la présence de la bactérie dans la rhizosphère de la plante, et d'autre part, un décalage temporel entre les exsudats inoculé et non inoculé. En effet, les pics relatifs aux divers composés flavonoïdiques apparaissent tout d'abord dans les exsudats inoculés puis dans les non inoculés et reflètent donc, non pas une différence qualitative, mais une différence quantitative décalée dans le temps.

III. Importance des caractéristiques structurales des inducteurs

Dans le chapitre précédent, nous avons vu l'importance des conditions d'induction (concentrations en inducteur, délai et temps d'induction) et nous avons testé quelques flavonoïdes communément rencontrés dans la littérature pour leurs propriétés stimulatrices ou inhibitrices de l'induction des gènes de nodulation. Ici, nous nous intéressons plus particulièrement à l'importance des caractéristiques structurales des inducteurs.

III.1. Effets sur l'induction des gènes nod

Nous avons donc testé les capacités inductrices du gène *nodA* de *M. nodulans* d'un panel de flavonoïdes représentatif des principales sous-classes à la fois synthétisées par les Légumineuses et référencées comme inductrices ou inhibitrices des gènes nod des rhizobia (Tableau VI). Les différences du niveau d'induction directement liées aux caractéristiques structurales de l'inducteur utilisé sont reprises ci-après.

La comparaison de la forme flavanone versus la forme flavone, révèle une diminution d'environ un tiers de l'induction. Ainsi, si l'on compare l'ériodictyol (3',4',5,7-tétrahydroxyflavanone) au kaempférol (3,4',5,7-tétrahydroxyflavone), on constate une diminution de 997 à 618 mU β -galactosidase. De même pour la naringénine (4',5,7-trihydroxyflavanone) versus l'apigénine (4',5,7-trihydroxyflavone), on note une diminution de 976 à 638 mU β -galactosidase.

L'ajout d'une substitution méthyléther en C-4' provoque une diminution drastique mesurée de l'induction comme ceci est rapporté pour : l'ériodictyol (3',4',5,7-tétrahydroxyflavanone) versus l'hespérétine (3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone) de 997 à 39 mU, le kaempférol (3,4',5,7-tétrahydroxyflavone) versus le kaempféride (3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone) de 617 à 6 mU et l'apigénine (4',5,7-trihydroxyflavone) versus l'acacétine (5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone) de 638 à 19 mU.

L'ajout d'un glucose entraîne également une forte diminution de l'induction voire l'annulation totale de l'induction (Tableau VI). Ceci est observé pour l'ajout d'un glucose en position C-7 sur la naringénine, la lutéoline et l'apigénine. Par ailleurs, l'ajout de ce même

sucré sur une position différente comme pour le kaempférol versus kaempférol 3-glucoside a le même effet.

Tableau VI. Capacité inductrice du gène *nodA* de *Methylobacterium nodulans* de différents flavonoïdes.

Inducteur	Synonyme	Niveau d'induction ^a
Naringénine	4',5,7-trihydroxy flavanone	976,2
Naringénine 7-O-glucoside	prunine	22,6
Sakuranétine	4',5-dihydroxy-7-méthoxy flavanone	0
Sakuranine	sakuranétine-5-glucoside	0
Eriodictyol	3',4',5,7-tétrahydroxy flavanone	996,7
Hesperétine	3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxy flavanone	39
Lutéoline	3',4',5,7-tétrahydroxy flavone	196,9
Lutéoline 7-O-glucoside	cynaroside	0
Kaempférol	3,4',5,7-tétrahydroxy flavone	617,2
Kaempférol-3-O-glucoside	astragaline	1,3
Kaempféride	3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxy flavone	6,2
Quercétine	3,3',4',5,7-pentahydroxy flavone	1,4
Quercétine 3-O-glucoside	isoquercitrine	0
Apigénine	4',5,7-trihydroxy flavone	638
Apigénine 7-O-glucoside	cosmosiine	65,6
Acacétine	5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone	19,1
Chrysine	5,7-dihydroxy flavone	74,5
Fisetine	3,3',4',7-tétrahydroxy flavone	520,2
Myricétine	3,3',4',5,5',7-hexahydroxy flavone	0
7-Methoxyflavone	-	0
Génistéine	4',5,7-trihydroxy isoflavone	0,3
Daidzéine	4',7-dihydroxy isoflavone	0,3
Daidzéine 7-O-glucoside	daidzéine	0,1
Formononétine	7-hydroxy-4'-méthoxy isoflavone	0
non induit (eau)	-	0

^a niveau d'induction mesuré par l'expression de la β -galactosidase, activité en mU β -galactosidase par mg de protéines solubles, 24 h après induction par 5 μ M de flavonoïde testé (2 répétitions).

Enfin, le fait le plus remarquable est qu'aucune des formes isoflavones testées ne provoque d'induction du gène *nodA* de *M. nodulans* comme on peut le constater avec l'apigénine (4',5,7-trihydroxyflavone) versus la génistéine (4',5,7-trihydroxyisoflavone) dont les capacités inductrices sont respectivement de 638 mU β -galactosidase et 0.

III.2. Effets sur la croissance bactérienne

Parmi leurs divers rôles, les flavonoïdes ont été référencés comme stimulateurs de la croissance bactérienne. Les flavonoïdes testés pour leur capacité à induire le gène *nodA* de

M. nodulans, ont donc également fait l'objet d'une analyse portant sur leur capacité stimulatrice de la croissance bactérienne (Fig. 33).

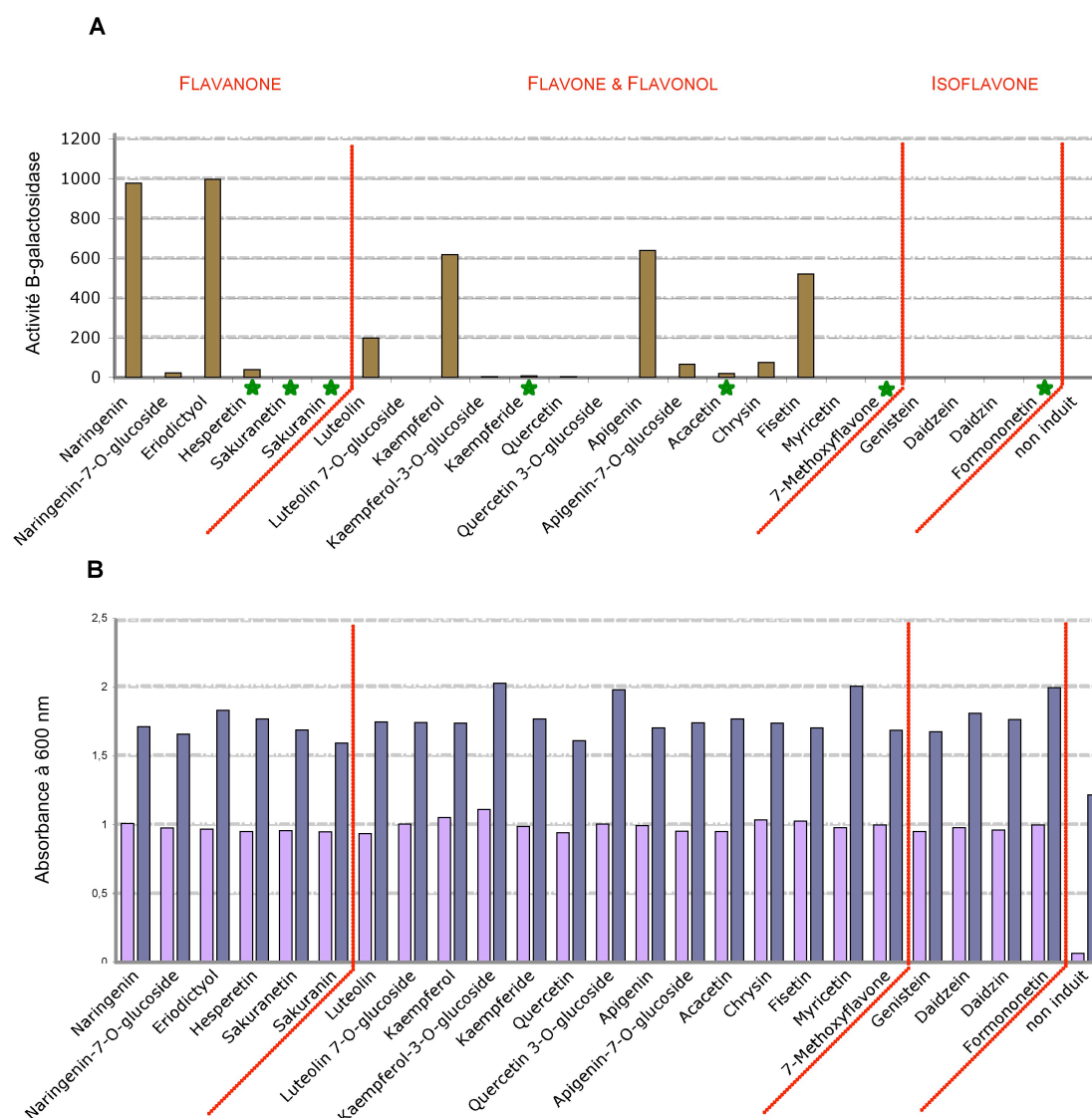


Figure 33. Tests d'un panel de flavonoïdes sur la capacité à induire les gènes nod (A) et à stimuler la croissance bactérienne (B).

A : capacité inductrice des flavonoïdes (reprise des résultats du tableau VI), les étoiles vertes notent la présence d'une substitution éther. B : capacité à stimuler la croissance bactérienne mesurée par l'absorbance d'une culture bactérienne de *M. nodulans* 24 h après ajout de 5 μ M du flavonoïde testé (mauve : milieu minimum M72, violet : milieu riche YM).

L'ajout de 5 μ M d'inducteur, quelle que soit la nature de ce dernier, provoque une augmentation de la densité bactérienne (Fig. 33B) à la fois en milieu minimum (M72) et sur milieu riche (YM).

Du fait de la possibilité de croissance en milieu minimum M72, il apparaît donc que *M. nodulans* est capable de métaboliser l'ensemble des composés testés pour se fournir en énergie carbonée. En milieu riche, on confirme une stimulation de la croissance bactérienne, lorsque que celui-ci est complémenté par un composé flavonoïdique par rapport au témoin non induit.

Il n'existe donc pas de corrélation entre la capacité inductrice des flavonoïdes envers les gènes nod de *M. nodulans* et la capacité à stimuler la croissance de la bactérie. En effet, un flavonoïde non inducteur, tel que les isoflavones, peut néanmoins être stimulateur de croissance.

III.3. Conclusions intermédiaires

Tout comme sa concentration ou le délai de son ajout dans la culture bactérienne, les caractéristiques structurales de l'inducteur (nombre de double liaisons, nombre, nature et position des substitutions, λ maximales en lumière UV) ont une importance capitale dans la réussite ou non de l'induction des gènes de nodulation.

Ainsi à partir d'un panel de flavonoïdes représentatif des différentes sous-classes de composés exsudés par les Légumineuses et connus comme étant inducteur ou inhibiteur des gènes nod, nous avons prospecté les structures essentielles ou non au succès de l'induction chez *M. nodulans*.

Il apparaît, au niveau des principales sous-classes, que les formes flavanones sont les plus actives quant à l'induction de l'expression du gène *nodA* de *M. nodulans*. Cette forme flavanone, correspondant à l'étape suivant la synthèse de la chalcone dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes, donne ensuite toutes les formes de flavonoïdes, ce qui peut expliquer sa capacité inductrice. La forme flavone, correspondant à la forme oxydée de la forme flavanone (présence d'une double liaison entre les carbone C-2 et C-3) est également une forme inductrice mais moindre. En revanche, les flavonoïdes de la sous-classe des isoflavones, ne sont pas inducteurs des gènes nod de *M. nodulans*. Il apparaît donc que l'attachement du cycle C en position C-2 est cruciale pour la reconnaissance du flavonoïde par la bactérie et, par suite, pour l'induction des gènes nod.

Par ailleurs, l'ajout de diverses substitutions sur le squelette de base des différentes formes évoquées ci dessus, sont également à prendre en considération. Ainsi, on remarque de façon constante que l'ajout d'un glucose ou d'un éther (substitutions les plus communément

rencontrées chez les Légumineuses) entraîne une perte de la capacité inductrice des composés. Toutefois, les mesures d'expression ayant été réalisées 24 h après induction, on ne peut exclure que, *in vivo*, ou sur des durées d'induction plus importantes, *M. nodulans* posséderait les enzymes nécessaires à la suppression des substitutions éther et glucose, conduisant à des composés non substitués inducteurs.

Enfin, nous avons pu établir qu'il n'existe pas de corrélation entre la capacité inductrice des flavonoïdes et leur rôle dans la stimulation de la croissance bactérienne. En effet, quelque soit le flavonoïde utilisé, présentant une capacité inductrice propre (nulle ou forte), la stimulation de la croissance de bactérienne de *M. nodulans* est identique (Fig. 33B).

IV. Spécificité de symbiose rhizobium - *Crotalaria*

Comprendre pourquoi *M. nodulans* ne s'associe qu'avec certaines espèces de crotalaires, *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* *C. podocarpa* reste donc une question de grand intérêt.

Répondre à cette interrogation suscitée par cette association spécifique nous a conduit, d'une part, à reprendre les travaux de Sy et al. (2001a) sur les tests d'inoculations croisées réalisés sur 10 espèces de crotalaires nodulées par *M. nodulans* et /ou *Bradyrhizobium* et, d'autre part, à étudier le profil chimique (CLHP) des exsudats racinaires de ces espèces.

IV.1. Spécificité de nodulation des *Crotalaria* étudiées

Des inoculations croisées ont été réalisées sur 10 espèces de crotalaires (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. grantiana*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa*, et *C. retusa*). Ces 10 espèces ont été inoculées selon 3 conditions : inoculation par *M. nodulans* ORS 2060, par *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 et par de l'eau stérile comme témoin négatif (Fig. 34).

Nous confirmons, par la biomasse des plantes (Tableau VII) et par la présence de nodules (Tableau VIII), l'existence de groupes de spécificité comme précédemment observés par Sy et al. (2001a).

Tableau VII. Tests d'inoculation croisées : relevé des biomasses obtenues.

Groupes de spécificité	Espèces	Poids sec moyen plante entière en mg*		
		Non inoculée	Inoculée avec ORS 1810	Inoculée avec ORS 2060
Groupe I	<i>C. glaucoïdes</i>	36 ± 2,5	56 ± 4	219,1 ± 15,9
	<i>C. perrottetii</i>	27 ± 1,9	27 ± 1,9	212,25 ± 15,2
	<i>C. podocarpa</i>	80 ± 5,7	85 ± 6,4	357,1 ± 25,4
Groupe II	<i>C. goreensis</i>	65 ± 4,2	291,2 ± 20,8	79,3 ± 5,2
	<i>C. grantiana</i>	26 ± 1,9	44,6 ± 3,1	30,9 ± 3,2
	<i>C. hyssopifolia</i>	24 ± 1,6	362,4 ± 25,9	19 ± 1,6
	<i>C. lathyroides</i>	22 ± 1,3	320,2 ± 22,4	31 ± 2,1
	<i>C. ochroleuca</i>	81 ± 6	404,2 ± 28,9	64,8 ± 4,2
	<i>C. retusa</i>	122 ± 8,3	351,2 ± 25,3	135,8 ± 9,9
Groupe III	<i>C. comosa</i>	50 ± 3,2	341,2 ± 23,9	69 ± 4,9

*moyenne calculée sur 15 plantes.



Figure 34. Tests d'inoculations croisées sur dix espèces de crotalaires.

Les inoculations ont été réalisées avec *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (étiquette rouge), *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 (étiquette bleue), de l'eau (étiquette jaune). Un test d'inoculation supplémentaire a été réalisé avec *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (étiquette rose) (données non présentées).

Le groupe I comprend les espèces *C. glaucoides*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa*, qui sont exclusivement nodulées par la souche à croissance rapide *M. nodulans* (Fig. 34, Tableaux VII et VIII).

Le groupe II rassemble 6 espèces de crotalaires, *C. grantiana*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*, qui forment des nodules lorsque les plantes sont inoculées par la souche à croissance lente *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 et *M. nodulans* ORS 2060 (Tableau VIII).

Enfin un dernier groupe (groupe III), ne contenant que *C. comosa*, est exclusivement nodulé par les bactéries du genre *Bradyrhizobium* (Tableau VIII).

Tableau VIII. Tests d'inoculation croisées : caractérisation des nodules observés.

Groupes de spécificité	Espèces	Présence de nodules chez les plantes inoculées avec	
		<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 1810	<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060
Groupe I	<i>C. glaucoides</i>	0	E
	<i>C. perrottetii</i>	0	E
	<i>C. podocarpa</i>	0	E
Groupe II	<i>C. goreensis</i>	E	I
	<i>C. grantiana</i>	E	I
	<i>C. hyssopifolia</i>	E	I
	<i>C. lathyroides</i>	E	I
	<i>C. ochroleuca</i>	E	I
	<i>C. retusa</i>	E	I
Groupe III	<i>C. comosa</i>	E	0

0 : pas de nodule, E : nodules effectifs (rose), I : nodules ineffectifs (blancs)

Néanmoins, au sein du groupe II, les espèces formant des nodules en interaction avec *M. nodulans* présentent des nodules non efficaces comme rapportés pour *C. retusa* (Fig. 35C). Ces nodules, que nous nommons pseudonodules, sont de formes comparables aux nodules formés avec *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 (Fig. 35A) mais sont exempts de bactéries. A la coupe, ces nodules apparaissent donc blancs (Fig. 35D) et non rosés comme ceci est observé communément (Hopkins, 2003) du fait de la présence de leghémoglobine révélatrice d'une activité nitrogénase fonctionnelle (Fig. 35B).

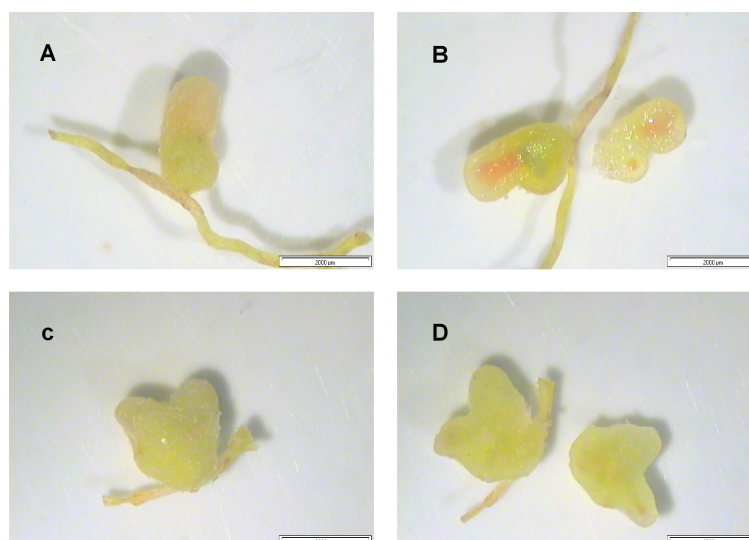


Figure 35. Nodules de *Crotalaria retusa*.

Nodules issus de plants de *C. retusa* inoculés avec *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 (A et B) ou *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (C et D).

IV.2. Capacité de fixation d'azote des crotalaires étudiées

Le potentiel fixateur d'azote a été mesuré par l'activité réductrice d'acétylène (ARA) selon la méthode de Hardy et *al.* (1973). Cette mesure a été effectuée sur des plantes âgées de 6 semaines (Tableau IX).

Tableau IX. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA).

Groupes de spécificité	Espèces	ARA spécifique moyenne* (nmol C ₂ H ₄ . h ⁻¹ .mg nodule sec ⁻¹)		
		<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 1810	<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	
Groupe I	<i>C. glaucooides</i>	0	12,38	± 0,18
	<i>C. perrottetii</i>	0	12,12	± 0,09
	<i>C. podocarpa</i>	0	33,11	± 0,28
Groupe II	<i>C. goreensis</i>	13,73	± 0,19	0
	<i>C. grantiana</i>	92,17	± 0,85	0
	<i>C. hyssopifolia</i>	15,63	± 0,13	0
	<i>C. lathyroides</i>	25,04	± 0,22	0
	<i>C. ochroleuca</i>	9,45	± 0,1	0
	<i>C. retusa</i>	3,31	± 0,08	0
Groupe III	<i>C. comosa</i>	6,85	± 0,1	0

* moyenne réalisée sur 15 plantes

Les mesures d'ARA ont été effectuées pour l'ensemble des conditions expérimentales (données non présentées). Les plantes possédant des nodules blancs montrent une réduction d'acétylène nulle confirmant l'inefficacité de ces derniers quant à la fixation d'azote et à l'absence de bactéries, comme observé sur les coupes.

Par ailleurs, lorsque l'on compare les ARA spécifiques (en nmol d'éthylène formées par mg de nodule sec par seconde) des couples bactérie-plante efficaces, on constate qu'il n'existe pas d'avantage direct, en termes de fixation d'azote, de s'associer à une bactérie méthylotrophe (Tableau VIII).

IV.3. Etude chimique préliminaire des exsudats racinaires des crotalaires étudiées par CLHP

Comme précédemment réalisé pour l'étude de l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* (cf. chapitre 2. II.), nous avons recueilli les exsudats racinaires de 6 autres espèces de crotalaires non inoculés (*C. glaucoïdes* et *C. perrottetii* du groupe I, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides* et *C. ochroleuca* du groupe II et *C. comosa* du groupe III) afin de réaliser une comparaison de leurs profils CLHP.

Sur la figure 36, sont présentés les profils CLHP des exsudats racinaires obtenus pour :

- les deux espèces, autre que *C. podocarpa*, entrant en symbiose avec *M. nodulans*, *C. glaucoïdes* (Fig. 36A) et *C. perrottetii* (Fig. 36B),
- les espèces *C. comosa*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, et *C. ochroleuca* entrant en symbiose avec *Bradyrhizobium* (Fig. 36C-F).

A concentration équivalente des échantillons (environ 0,25% de résidu sec repris dans l'eau), les exsudats racinaires de *C. glaucoïdes* et de *C. perrottetii* semblent posséder une diversité de composés dont les caractéristiques, en termes de temps de rétention, sont comprises entre 30 et 60 min, pour des λ . maximales, comprises entre 200 et 400 nm. Chez ces deux espèces, le pic PO2 (TR = 43,22 min) détecté chez *C. podocarpa* est retrouvé : il s'agit du pic GL2 chez *C. glaucoïdes* (TR = 45,60 min) et du pic PE2 chez *C. perrottetii* (TR = 45,82 min). En se focalisant dans la zone de λ maximales représentative des flavonoïdes, entre 240 et 340 nm, on note la présence de deux pics particuliers chez *C. glaucoïdes* (GL1, TR = 42,29 min et GL3, TR = 56,24 min) et un pic chez *C. perrottetii* (PE1, TR = 40,72 min), ne correspondant ni aux pics présents chez *C. podocarpa*, ni aux flavonoïdes de références (Mabry et al., 1970).

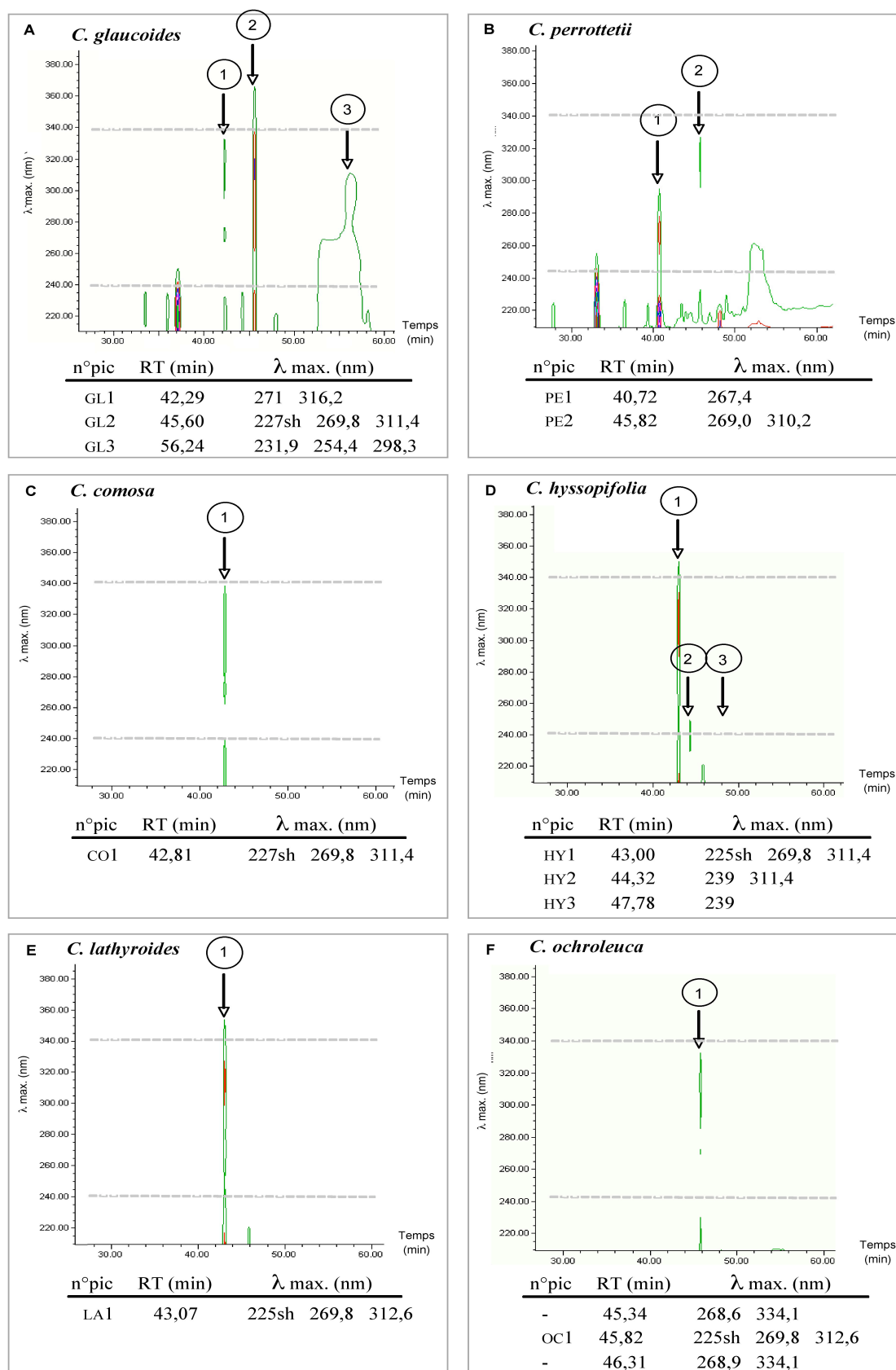


Figure 36. Chromatogrammes CLHP des exsudats racinaires de 6 espèces de *Crotalaria* (200 nm < λ < 400 nm).

A : *C. glaucoides*, B : *C. perrottetii*, C : *C. comosa*, D : *C. hyssopifolia*, E : *C. lathyroides*, F : *C. ochroleuca*.

Pour les 4 espèces de crotalaires nodulées par *Bradyrhizobium*, les profils CLHP des exsudats racinaires révèlent la présence constante de pic, équivalent au pic PO2 révélé chez *C. podocarpa*. Il s'agit des pics : CO1 (TR = 42,81 min) chez *C. comosa*, HY1 (TR = 43 min) chez *C. hyssopifolia*, LA1 (TR = 43,07 min) chez *C. lathyroides* et OC1 (TR = 45,82 min) chez *C. ochroleuca*.

Pour l'exsudat racinaire de *C. hyssopifolia*, la présence de deux autres pics possédant une λ . maximale commune à 239 nm a été montrée mais ces deux pics restent non identifiés. Néanmoins, le fait que le pic HY2 présente une signature spectrale composé de deux λ . maximales (239 et 311,4 nm) contrairement au pic HY3 n'en possédant qu'une seule (239 nm), laisse envisager chez cette espèce la possibilité d'une co-élution d'au moins deux composés au sein du pic HY2 et par extrapolation, de l'ensemble des pics contenant une λ . maximale de 312 nm.

Enfin, dans l'exsudat racinaire de *C. ochroleuca*, en plus du pic OC1, deux composés mineurs (traces non visualisables sur le chromatogramme de la figure 36F) sont détectées aux temps de rétention 45,34 et 46,31 min, et présentent tous les deux des signatures spectrales (λ . max : 268,9 et 334,1 nm) et des temps rétention très proches de ceux de l'apigénine 7-O-glucoside.

IV.4. Conclusions intermédiaires

L'étude réalisée sur la spécificité de nodulation et de fixation d'azote chez les espèces de crotalaires révèle trois groupes de spécificité. Un premier, comprenant les espèces *C. glaucoides*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa*, est exclusivement nodulé par *M. nodulans*. Le second groupe, rassemblant les espèces *C. grantiana*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*, est nodulé efficacement par des bactéries du genre *Bradyrhizobium*, et forment des pseudonodules (nodules de structures identiques mais exempts de bactérie) lorsque l'inoculation est réalisée avec *M. nodulans*. Enfin, l'espèce *C. comosa* est exclusivement nodulée par les bactéries du genre *Bradyrhizobium*, aucune structure de type pseudonules ayant été observée avec *M. nodulans*.

Par ailleurs, nous avons montré, que le fait de s'associer avec une bactérie méthylotrophe n'apportait pas d'avantages quant à la fixation d'azote. En effet, les espèces *C. podocarpa*, *C. glaucoides* et *C. perrottetii* apparaissent respectivement en second, 6^{ème} et 7^{ème} rang en terme de capacité fixatrice d'azote (Tableau X).

Tableau X. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA).

Plante/Bactérie	ARA spécifique moyenne* (nmol C ₂ H ₄ . h ⁻¹ .mg nodule sec ⁻¹)
<i>C. grantiana</i> / ORS 1810	92,17
<i>C. podocarpa</i> / ORS 2060	33,11
<i>C. lathyroides</i> / ORS 1810	25,04
<i>C. hyssopifolia</i> / ORS 1810	15,63
<i>C. goreensis</i> / ORS 1810	13,73
<i>C. glaucoides</i> / ORS 2060	12,38
<i>C. perrottetii</i> / ORS 2060	12,12
<i>C. ochroleuca</i> / ORS 1810	9,45
<i>C. comosa</i> / ORS 1810	6,85
<i>C. retusa</i> / ORS 1810	3,31

* moyenne réalisée sur 15 plantes

Du fait de la disponibilité du matériel végétal et des connaissances des spécificités de nodulation de chacune des espèces, nous avons entrepris une étude préliminaire de la caractérisation des exsudats racinaires de 7 espèces dans l'hypothèse qu'il existait une ou des molécule(s) spécifique(s) de nature flavonoïdique suivant les groupes de spécificité.

Aucune piste réponse en ce sens n'a pu être obtenue en raison d'une trop faible quantité d'exsudat recueillie pour 6 d'entre elles.

Nous avons néanmoins mis en évidence un pic commun à l'ensemble des espèces des crotalaires nodulées soit par *M. nodulans* soit par *Bradyrhizobium* dont la signature spectrale laisse envisager la présence de deux composés l'un flavonoïde se rapprochant de l'apigénine 7-*O*-glucoside (λ_{\max} 268 et 333 nm) ou de l'acacétine 7-*O*-glucoside (λ_{\max} 268 et 324 nm). La seconde λ . maximale de la signature spectrale de ces deux flavones, respectivement 333 et 324 nm, pourrait être masquée par un composé absorbant aux alentours de 312 nm (Fig. 37).

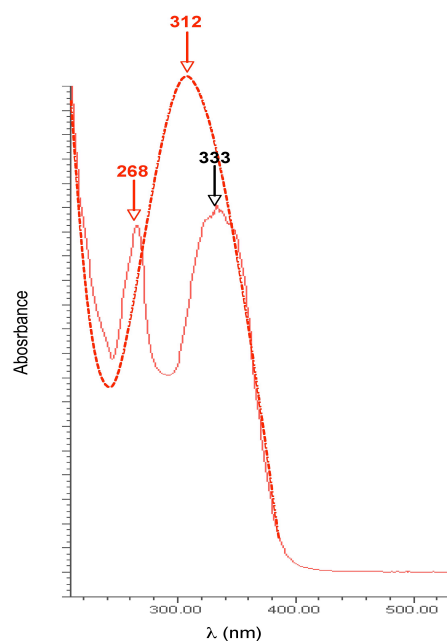


Figure 37. Illustration de l'hypothèse d'une co-élution entre l'apigénine 7-*O*-glucoside (λ_{\max} 268 et 333nm) et un composé X (λ_{\max} 312 nm). En rouge les λ_{\max} détectées lors du spectre UV du composé, en noire, la λ_{\max} masquée.

V. Discussion générale

V.1. Exsudats racinaires de *C. podocarpa*

Du fait que *M. nodulans* entre spécifiquement en symbiose avec trois espèces du genre *Crotalaria* (*C. glaucoides*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa*) et que sur les nodules des autres espèces de crotalaires, ce sont principalement des bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* qui ont été isolées (Gao *et al.*, 1994 ; Samba *et al.*, 1999 ; You *et al.*, 2002), nous avons été amenés à émettre l'hypothèse suivante. Les principaux composés toxiques produits et libérés dans la rhizosphère, par les crotalaires étant des alcaloïdes de type pyrrolizidinique, ces composés ne pourraient-ils pas avoir une influence sur l'établissement de la relation symbiotique entre la crotalaire et les *Methylobacterium* ou les *Bradyrhizobium*. Par ailleurs, la structure et la concentration des alcaloïdes identifiés chez les crotalaires nodulées par *Bradyrhizobium* pourraient différer de celles des alcaloïdes présents chez les trois espèces de crotalaires en symbiose avec *M. nodulans*. Ces composés pourraient alors rendre toxique la rhizosphère de ces trois espèces de crotalaires pour les *Bradyrhizobium*. Or, d'après nos résultats, il apparaît qu'il n'y a pas d'effet toxique des exsudats racinaires de *C. podocarpa* envers la croissance de *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810. Ceci laisse entrevoir que les *Bradyrhizobium*, tout comme les *Methylobacterium*, peuvent s'adapter à la rhizosphère de cette espèce.

Nous avons parallèlement étudié la cinétique d'exsudation de *C. podocarpa* à la fois en présence et en absence de *M. nodulans* dans sa rhizosphère. En effet, la présence de rhizobia, dans la rhizosphère des Légumineuses, peut influencer la quantité de certains flavonoïdes libérés par les racines. Ainsi, des augmentations de l'expression des gènes nod, ont été décrites chez le trèfle blanc (Rolfe *et al.*, 1988), la vesce (van Brussel *et al.*, 1990), le soja (Cho & Harper, 1991) et la luzerne (Dakora *et al.*, 1993a), pour lesquels l'expression étaient induites par les flavonoïdes présents dans l'exsudat et les extraits racinaires après inoculation par des rhizobia. En termes de composés spécifiques, et à titre d'exemple, il a été montré que les exsudats racinaires de *Phaseolus vulgaris* inoculées avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* contiennent une quantité plus importante de phytoalexine (3,9-dihydrocoumestane) et de son précurseur flavonoïdique la daidzéine, de naringénine, de liquiritigénine (4',7-dihydroxyflavanone) et d'isoliquiritigénine (2',4',4-trihydroxychalcone) que les exsudats de plantes non inoculées (Dakora *et al.*, 1993b ; Bolanos-Vasquez & Werner, 1997). Cette

présence du partenaire bactérien dans la rhizosphère peut également influencer sur la nature des flavonoïdes synthétisés et exsudés. Par exemple, chez *Trifolium subterraneum*, la liquiritigénine a été trouvée comme composé additionnel et inducteur des gènes nod, dans les exsudats racinaires trois jours après inoculation avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Lawson et al., 1996).

Pour les exsudats racinaires de *C. podocarpa*, on démontre une différence quantitative marquée des 5 composés préalablement identifiés. Les exsudats racinaires inoculés contiennent une concentration plus élevée de ces composés. Cette différence apparaît la plus importante 8 jours après germination puis elle semble s'amoinrir. Par ailleurs, 12 jours après germination, un composé supplémentaire, possédant une signature spectrale très proche de la daidzéine, est détecté dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* inoculé avec *M. nodulans*. Toutefois, on ne peut conclure à ce stade qu'il s'agisse d'un nouveau flavonoïde exsudé dont la biosynthèse serait directement liée à la présence de la bactérie dans la rhizosphère de la plante.

V.2. Importance des caractéristiques structurales des inducteurs

Les relations entre la structure des flavonoïdes et leurs propriétés inductrice ou inhibitrice des gènes nod sont manifestes. Nous avons montré que, tout comme sa concentration ou le délai de son ajout dans la culture bactérienne, les caractéristiques structurales de l'inducteur ont une importance capitale dans la réussite ou non de l'induction des gènes de nodulation de *Methylobacterium nodulans*.

Ainsi à partir d'un panel de flavonoïdes représentatif des différentes sous-classes de composés exsudés par les Légumineuses et connus comme étant inducteurs ou inhibiteurs des gènes nod, nous avons prouvé que les composés de type flavanone sont les plus actifs quant à l'induction. La forme flavone, correspondant à la forme oxydée de la forme flavanone (présence d'une double liaison entre les carbone C-2 et C-3) est également une forme inductrice mais dans une moindre mesure.

En revanche, le fait marquant est que les flavonoïdes de la sous-classe des isoflavones ne sont pas inducteurs des gènes nod de *M. nodulans*. En effet, comme nous l'avons vu, la majorité des crotalaires entrent en symbiose avec des bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Or les gènes de nodulation de ce genre bactérien sont référencés comme étant induits par les flavonoïdes de la sous-classe des isoflavones. Ainsi, il a été rapporté que la génistéine, la daidzéine et la daidzine sont les meilleurs inducteurs des gènes nod de *B. japonicum* (Banfalvi et al., 1988 ;

Subramanian et *al.*, 2006), de même pour la génistéine et la daidzéine sur les gènes *nod* de *Bradyrhizobium* sp. NC92 (Gilette & Elkan, 1996). Or ici, il apparaît clairement que l'attachement du cycle C en position C-2, et non en C-3 comme cela est retrouvé pour les isoflavones, est crucial pour la reconnaissance du flavonoïde par la bactérie et, par suite, pour l'induction des gènes *nod*.

Par ailleurs, l'ajout de diverses substitutions sur le squelette flavonoïdique, autres que les hydroxylations, joue également un rôle dans la réussite de l'induction. Ainsi, la présence d'un glucose ou d'un éther (substitutions les plus communément rencontrées chez les Légumineuses) entraîne une perte de la capacité inductrice. Néanmoins, les rhizobia n'étant pas des organismes inertes dans ce contexte, il est possible que *M. nodulans* puisse induire la biosynthèse d'enzymes spécifiques dévouées à l'élimination de ces substitutions permettant ainsi de retrouver la forme génine d'un flavonoïde inducteur donné. Ainsi, même s'il semble que *C. podocarpa* exsude des molécules se rapprochant de l'apigénine 7-*O*-glucoside, non inducteur lors des tests *in vitro*, la métabolisation de ce composé par le *Methylobacterium* conduirait à la forme génine, qui elle, possède la capacité à induire l'expression des gènes *nod* chez la bactérie.

Des effets positifs ou négatifs des flavonoïdes ont été décrits sur la croissance des bactéries. On peut noter que la médicarpine et la kievitone isolées de racines de soja sont de forts inhibiteurs de croissance pour *B. japonicum*, *R. lupini*, et deux rhizobia à croissance rapide du *Lotus*, tandis que la phaséoline et la maakiaïne sont un peu moins inhibitrices. A l'inverse, D'Arcy Lameta et Jay (1987) rapportent un effet stimulateur de faibles concentrations de daidzéine sur la croissance de *B. japonicum*. La génistéine, la naringénine, la chrysine et l'apigénine sont des promoteurs de la croissance de *Sinorhizobium fredii* USDA257 en fin de phase exponentielle (Lin et *al.*, 1999). La quercétine, la quercétine 3-*O*-galactoside, la lutéoline et la lutéoline 7-*O*-glucoside augmentent la vitesse de croissance de *S. meliloti* (Hartwig & Phillips, 1991 ; Jain & Nainawatee, 1999). Par ailleurs, Hartwig et Phillips (1991) proposent que le mécanisme sous-jacent à la stimulation de croissance par la lutéoline chez *S. meliloti* soit indépendant de l'induction des gènes *nod* puisque des mutants défectueux dans les gènes de régulation *nodD* montrent une augmentation de la vitesse de croissance.

Nous confirmons cette hypothèse. En effet, nous avons pu établir que l'ensemble des composés testés, inducteurs ou non, entraîne une augmentation de la croissance bactérienne à la fois en milieu riche et en milieu minimum révélant ainsi la capacité de *M. nodulans* à

métaboliser ces composés pour se fournir en énergie carbonée. Nous montrons donc qu'il n'existe pas de corrélation entre les capacités inductrices des flavonoïdes et leur rôle dans la stimulation de la croissance bactérienne.

V.3. Spécificité de symbiose

Du fait de la complexité de la spécificité de l'interaction entre les deux partenaires symbiotiques, il est difficile de prédire par avance quels types de bactéries seront isolées à l'intérieur des nodules d'une Légumineuse donnée et à l'inverse, de prédire le spectre de Légumineuses hôtes pour une bactérie particulière. De plus, outre la réussite ou non de la mise en place d'une symbiose fonctionnelle, une variabilité dans l'induction puis l'efficacité de celle-ci peuvent être observées. C'est ainsi que chez le trèfle blanc par exemple, une inoculation avec *R. leguminosarum* bv. *viciae* donne une augmentation de quatre fois, l'activité des gènes nod inductibles quand elle est comparée à une inoculation avec *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rolfe et al., 1998).

L'étude que nous avons réalisée a révélé trois groupes de spécificité d'association. Un premier comprend des espèces exclusivement nodulées par *M. nodulans* (*C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. comosa*). Un second groupe (*C. grantiana*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca* et *C. retusa*), rassemble les espèces nodulées efficacement par des bactéries du genre *Bradyrhizobium*, et forme des pseudonodules en interaction avec *M. nodulans*. Enfin, un dernier groupe, représenté par l'espèce *C. comosa*, est exclusivement nodulé par les bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Par ailleurs, nous avons décrit que l'association avec une bactérie méthylotrophe (groupe I) n'apporte pas d'avantage quant à la fixation d'azote. En effet, les espèces *C. podocarpa*, *C. glaucoïdes* et *C. perrottetii* apparaissent respectivement en second, 6^{ème} et 7^{ème} rang en terme de capacité fixatrice d'azote.

La présence de pseudonodules nous permet de formuler l'hypothèse que la non-réussite d'une symbiose efficace entre les espèces de crotalaires du groupe II et *M. nodulans*, relève d'un problème au niveau du processus d'infection (entrée des bactéries dans le primordium nodulaire) et non du processus de pré-infection (mise en place du dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques). En effet, les cas de pseudonodules référencés dans la littérature, nous apprennent que ces nodules formés sont similaires aux nodules vides élicités par traitement des racines des facteurs Nod purifiés (Truchet et al., 1991). De plus, les souches de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 mutées dans les gènes codant les

exopolysaccharides (mutants *exo*⁻), forment ces mêmes structures nodulaires vides de bactéries ou bactéroïdes (Finan et al., 1985 ; Leigh et al., 1985, 1987 ; Yang et al., 1992 ; Gonzalez et al., 2003).

Nous avons ensuite réalisé une étude chimique préliminaire des exsudats racinaires de différentes espèces représentatives des groupes de spécificité I, II et III pour vérifier s'il existait une diversité de composés flavonoïdique propre à chacun des groupes. Nous n'avons pu identifier de molécules propres à chacun des trois groupes de spécificité, du fait des trop faibles concentrations des échantillons d'exsudats racinaires pour 6 des 7 espèces testées. En revanche nous avons mis en évidence la présence d'un composé commun aux 7 espèces dont l'identification n'a pas encore été réalisée.

Enfin, l'ensemble de nos résultats, combinés aux données de la littérature, nous permettent de confirmer, ou tout du moins de renforcer, certaines hypothèses émises. Ainsi, chez *C. retusa*, espèce appartenant au second groupe de spécificité, deux flavonoïdes, la quercétine et la vitexine 4-*O*-galactoside, ont été identifiés à partir d'extrait de plante entière (Srinivasan & Subramanian & Nagarajan, 1969). Nos résultats d'induction montrent que la quercétine n'est pas capable d'induire l'expression du gène *nodA* chez *M. nodulans*. En revanche, la vitexine 4-*O*-galactoside correspondant à de l'apigénine 8-*C*-glucoside substituée par un galactoside en position C-4, dans l'hypothèse où *M. nodulans* serait capable de supprimer les substitutions des composés flavonoïdes pour atteindre la forme génine, pourrait être inductrice des gènes *nod* de *M. nodulans*. Ceci permettrait la mise en place du dialogue moléculaire entre ces deux partenaires et confirmerait que la non-réussite de la mise en place d'une symbiose fonctionnelle serait due au processus d'infection et non de pré-infection.

Chez *C. podocarpa*, espèce appartenant au groupe I, l'apigénine 7-*O*-apiofuranosyl (1→6)-β-glucopyranoside a été identifiée à partir d'extrait des parties aériennes de la plante (Wanjala & Majinda, 1999). Nous confirmons donc par nos expérimentations, la capacité d'induction des gènes *nod* de *M. nodulans* par la forme génine, l'apigénine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Les travaux menés au cours de cette thèse sur l'étude de la symbiose entre une Légumineuse du genre *Crotalaria*, *C. podocarpa*, et une bactérie méthylotrophe, *Methylobacterium nodulans*, nous ont permis d'une part, d'aborder la compréhension de la mise en place de cette association originale du fait de ses partenaires et, d'autre part, d'établir des hypothèses quant aux mécanismes et au dialogue moléculaire intervenant dans cette interaction mutualiste.

I. Propriétés méthylotrophiques du partenaire bactérien et conséquences sur sa plante-hôte

La méthylotrophie, principale caractéristique de *M. nodulans*, consistant en la capacité à dégrader les composés mono-carboné tel que le méthanol, est impliquée dans le processus symbiotique : i) elle apporte un avantage quant au développement de la plante associée à ce partenaire bactérien et ii) elle joue un rôle dans les remaniements physiologiques et structurels du nodule.

Nous avons tout d'abord montré que l'inoculation de *C. podocarpa* par des bactéries ayant perdu leurs propriétés méthylotrophiques, conduit à une symbiose fixatrice d'azote fonctionnelle, tout en provoquant (i) une diminution de croissance des plantes de plus de 40% accompagnée (ii) d'une réduction drastique du nombre de nodules et (iii) d'une baisse de l'efficacité de la fixation d'azote. Ces résultats ont fait l'objet d'une première publication (Jourand et *al.*, 2005).

Ensuite, l'étude des nodules de *C. podocarpa* a permis de caractériser ses nodules de type indéterminé, fixateur d'azote, présentant une compartimentation classique en 4 zones. On retrouve une zone méristématique dédiée à la croissance du nodule, une zone sous-jacente, apicale, où s'exprime la méthylotrophie, une potentielle zone de fixation d'azote et une zone de sénescence. D'importantes singularités sont à signaler notamment la forme et la taille inhabituellement grandes des bactéroïdes de *M. nodulans*, supposant une demande énergétique plus importante que dans les cas classiques, et paradoxalement, une accumulation d'amyloplastés dans l'ensemble du nodule. La méthylotrophie s'exprimant à l'apex du nodule, une dégradation apicale marquée est observée suite à une désorganisation puis une digestion des parois, libérant du méthanol directement utilisable par la bactérie. Les bactéries différenciées en bactéroïdes produisent alors eux-mêmes l'énergie nécessaire à l'activité de la

nitrogénase, autorisant ainsi la plante à accumuler des réserves carbonées dans les cellules infectées.

Toutefois, la méthylotrophie n'étant localisée qu'à l'apex du nodule, cette hypothèse de fonctionnement ne peut pas s'appliquer à l'ensemble de la zone de fixation d'azote. Nous proposons donc 4 stades de différenciation des bactéries (S1 à S4) : S1, méthylotrophe non fixateur d'azote, S2, méthylotrophe et fixateur d'azote, S3, non méthylotrophe et fixateur d'azote et enfin S4, non méthylotrophes et dans lequel l'activité nitrogénase est éteinte. Il existe donc, au sein du nodule, une zone se limitant à quelques couches cellulaires où se trouvent des bactéroïdes méthylotrophes et fixateurs d'azote. L'énergie supplémentaire apportée par la méthylotrophie n'étant plus allouée à la différenciation des bactéroïdes, elle serait redirigée pour l'activité de la nitrogénase, permettant ainsi à la bactérie de stocker l'énergie carbonée apportée par les photosynthétats en amidon. Le « remplissage » en amyloplastés résulterait alors de la croissance du nodule et de "l'avancée" de cette interzone « expression de la méthylotrophie – fixation d'azote » contenant les bactéroïdes en stade S2.

Perspectives

Accumulation d'amidon

✓ Vérifier l'existence d'un lien direct entre l'accumulation de l'amidon au sein des nodules et les propriétés méthylotrophiques du partenaire bactérien, serait une première perspective de travail. Pour cela, il faudrait compléter les informations obtenues par la méthode colorimétrique, par le dosage de l'amidon dans les extraits de nodules de *C. podocarpa*, issus de l'inoculation par la bactérie sauvage en comparaison avec ceux obtenus par inoculation avec des souches mutantes non méthylotrophes. De plus, en réalisant le dosage de l'amidon également sur des extraits de nodules de *C. glaucoïdes* et de *C. perrottetii*, inoculés avec *M. nodulans*, nous pourrions savoir si cette accumulation de composés de réserve est spécifique à l'espèce, à un groupe de spécificité de nodulation, ou bien encore au genre *Crotalaria*, ceci en élargissant dans ce cas le panel des plantes à étudier.

Fixation d'azote

✓ Vérifier que les bactéries en stade S2 sont fixatrices d'azote permettrait de conclure si l'énergie apportée par la méthylotrophie au sein d'un bactéroïde peut être redirigée vers la nitrogénase. Pour cela l'inoculation d'une bactérie recombinée ORS 2060 pm *nifH-LacZ* suivie de la réalisation de coupes de nodule et de la révélation histochimique et/ou par dosage des ARNm de *nifH* par PCR quantitative sur des sections précises du nodule, peuvent être envisagés.

II. Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques

La formation des nodules racinaires met en jeu un dialogue moléculaire complexe entre la plante-hôte et les rhizobia. La plante secrète des signaux principalement de type flavonoïdique ; la perception de ces signaux par la bactérie induit l'expression de nombreux gènes bactériens dont les plus étudiés sont les gènes *nod*. Bien que plusieurs travaux aient porté sur la symbiose entre les bactéries du genre *Methylobacterium* et les espèces du genre *Crotalaria*, aucune expérimentation ne portait sur le dialogue moléculaire se mettant en place entre les deux partenaires pour aboutir à une symbiose fonctionnelle et efficace.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons montré que l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* possède bien la capacité d'induire l'expression du gène *nodA* de *M. nodulans*. Les analyses par CCM et CLHP ont démontré la présence de flavonoïdes de type flavone (pics PO1 à PO5) présentant des caractéristiques spectrales proches de l'apigénine-7-*O*-glucoside et/ou de l'acacétine-7-*O*-glucoside. L'identification de l'apigénine 7-*O*- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside, isolée des parties aériennes de *C. podocarpa*, renforce ces résultats (Wanjala & Majinda, 1999). Ces potentiels dérivés de l'apigénine (PO1 à PO5) pourraient être les inducteurs naturels des gènes *nod* de *M. nodulans*.

Perspectives :

- ✓ Pour pouvoir conclure sur cette question, il faudrait réaliser dans un premier temps des tests d'induction du gène *nodA* de *M. nodulans* avec les 5 pics précédemment mentionnés des exsudats racinaires de *C. podocarpa*, qui auront été collectés par chromatographie liquide haute performance semi-préparative voire préparative.
- ✓ Dans un second temps, il faudrait poursuivre par la détermination des structures des flavonoïdes représentés par les pics préalablement bien séparés. Ceci pourrait être réalisé par l'utilisation de techniques spectrales complémentaires telles que le couplage chromatographie liquide haute performance / spectrométrie de masse (CL-SM) ou la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Concernant les gènes de nodulation, si la présence du gène *nodA* chez *M. nodulans* a déjà été rapportée, aucun lien direct avec son rôle au sein du dialogue moléculaire n'avait encore été établi. Ainsi, nous avons vérifié au cours de ces travaux, la présence d'autres gènes *nod* et caractérisé un fragment ADN de 7,13-kb contenant 6 gènes, codant les protéines NodA,

NodB, NodC, NodI, NodJ et NodH, et des séquences partielles des gènes *nodD*, *nodU*, *nodQ* ainsi que d'une transposase. Ces gènes sont similaires à ceux des autres rhizobia bien qu'ils constituent un cluster qu'il partage avec *Methylobacterium* 4-46 (isolé de *Lotononis bainesii*) et *Burkholderia tuberum* STM 678 (isolé d'*Aspalathus carnosa*). Comme la plupart des espèces de *Methylobacterium* sont non symbiotiques, il est probable que la capacité symbiotique attribuée, ne soit pas un caractère ancestral mais qu'il ait été acquis par transfert horizontal. La présence d'une relique de transposase au sein du fragment de génome analysé, renforce cette hypothèse. L'hôte d'origine de ce transfert reste inconnu ; ce transfert peut être survenu chez l'ancêtre commun de *Methylobacterium* et de *Burkholderia* suivi par transmission verticale et co-évolution de chaque espèce avec leurs plantes-hôtes conduisant ainsi à une haute spécificité entre les partenaires symbiotiques *M. nodulans*/*Crotalaria* sp. et *Methylobacterium* sp./*Lotononis* sp. Il est intéressant de noter que les plantes-hôtes de la branche *Methylobacterium-Burkholderia* appartiennent à la même tribu des *Crotalarieae* (à savoir les espèces *Aspalathus*, *Crotalaria* et *Lotononis*). Cette tribu des Légumineuses pourrait avoir des prédispositions pour former des symbioses avec ces rhizobia dont la fonction première n'est pas d'interagir dans une association mutualiste.

Pour comprendre la régulation de gènes *nod*, nous avons utilisé une souche de *M. nodulans* ORS 2060 recombinée, avec une fusion transcriptionnelle *LacZ* dans le promoteur du gène *nodA*. Cette souche a représenté un formidable outil pour déterminer les conditions d'induction adaptées à *M. nodulans*. Il existe en effet une plage de temps étroite conduisant à une induction optimale, prenant en compte à la fois la concentration en inducteur (5 μ M), la densité bactérienne lors de l'ajout de l'inducteur (0,1A à 600 nm) et le temps d'induction (30 h). En utilisant l'apigénine comme inducteur, nous avons pu produire, isoler puis identifier une structure de facteur Nod : il s'agit d'un pentamère de N-acétyl glucosamine substitué par un sulfate à l'extrémité réductrice et par deux chaînes d'acyle, soit l'acide vaccénique (C_{18:1}) soit l'acide palmitique (C_{16:0}), respectivement en proportion 10 pour 1, à l'extrémité non réductrice.

L'ensemble des résultats sur la caractérisation du dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques, *M. nodulans* et *C. podocarpa*, ont fait l'objet d'une seconde publication (Renier et al., 2008).

Perspectives

- ✓ Pour compléter ces résultats, une étude d'ensemble, à la fois sur les gènes *nod* et sur les facteurs Nod, serait à mener. La première partie de cette étude consisterait à vérifier l'existence d'une ou plusieurs copies du gène *nodD* et de rechercher, en s'appuyant sur le séquençage du génome complet de *M. nodulans* actuellement au cours, la présence au sein du génome de la bactérie d'autres gènes *nod*. L'induction des gènes de nodulation étant sous contrôle de la protéine NodD, on ne peut alors exclure l'existence d'autres structures de facteurs Nod, flavonoïdes inducteurs-dépendants, suivant les gènes de nodulation spécifiques activés.
- ✓ La seconde partie de ce travail serait de réaliser la production de facteurs Nod par l'induction des exsudats racinaires et non de composés exogènes, afin de se rapprocher des conditions rencontrées « en champs ».

III. Spécificité de symbiose

Les composés sécrétés par les racines des Légumineuses sont au même titre que les facteurs Nod, déterminants pour la réussite de la symbiose et à sa spécificité. Pour comprendre la spécificité de symbiose entre *M. nodulans* et ces plantes-hôtes, nous nous sommes intéressées dans un premier temps à l'influence de la bactérien dans la rhizosphère de ces plantes. Ainsi, au sein des exsudats racinaires de *C. podocarpa*, une semaine après germination, nous avons pu séparer 5 pics de nature flavonoïdique (PO1 à PO5) présentant une différence quantitative marquée d'environ un tiers supérieur chez les exsudats inoculés par le partenaire bactérien *M. nodulans* par rapport aux non inoculés,. Douze jours après germination, un composé supplémentaire, PO6, possédant une signature spectrale très proche de la daidzéine, est également détecté dans l'exsudat racinaire de *C. podocarpa* inoculé avec *M. nodulans*.

Dans un second temps, les travaux ont porté sur les caractéristiques structurales des inducteurs des gènes *nod*, permettant ou non, la reconnaissance par la ou les protéines régulatrices NodD. Un panel de flavonoïdes représentatif des différentes sous-classes de composés exsudés par les Légumineuses et connus comme étant inducteur ou inhibiteur des gènes *nod*, a donc été testé quant à leur capacité à induire le gène *nodA* chez *M. nodulans*. Les flavanones sont les plus actives quant à l'induction de l'expression du gène *nodA* de *M. nodulans*. A l'intérieur de la voie de biosynthèse, elles représentent une forme « non spécialisée » puisqu'elles sont (notamment la naringénine) le précurseur commun à toutes les

autres sous-classes (Winkel-Shirley, 2002). Les flavones, forme oxydée des précédentes, possèdent également une capacité d'induction d'environ deux tiers inférieures à celles des flavanones. Enfin, et paradoxalement, les isoflavones (telle la daidzéine, seul composé formellement identifié dans les exsudats et principal inducteur des *Bradyrhizobium*), ne sont pas inductrices des gènes nod de *M. nodulans*. Il apparaît donc que l'attachement du cycle C en position C-2 est déterminante pour la reconnaissance du flavonoïde par la bactérie et, par suite, pour l'induction des gènes nod. Par ailleurs, l'ajout de substitutions (glucose et/ou éther, substitutions les plus communément rencontrées chez les Légumineuses) sur le squelette flavonoïdique entraîne une perte de la capacité inductrice des composés.

En complément, nous avons pu établir qu'il n'existe pas de corrélation entre la capacité inductrice des flavonoïdes et leur rôle dans la stimulation de la croissance bactérienne. En effet, quel que soit le flavonoïde utilisé, présentant une capacité inductrice propre (nulle ou forte), la stimulation de la croissance bactérienne de *M. nodulans* est identique.

Perspectives

- ✓ Afin de déterminer si l'exsudation de la daidzéine est directement liée à la présence de la bactérie (différence qualitative) ou relève d'un retard dans l'exsudation des composés lorsque la bactérie est absente, il faudrait poursuivre l'étude des exsudats racinaires en présence ou non de la bactérie dans la rhizosphère sur des temps d'expérimentation plus longs. Autrement dit, il conviendrait de vérifier si la présence de la bactérie dans la rhizosphère stimule l'exsudation, en termes de temps et de quantité, ou influence la composition chimique, en induisant la synthèse de nouveaux composés, dans ces exsudats.
- ✓ De plus, il faudrait s'assurer si *M. nodulans* est ou non capable d'induire la synthèse d'enzymes dévolues à la coupure des substitutions telles que des glucosidases ou des méthoxylases, ceci pourra être réalisé par la recherche de séquences ADN similaires à celles des gènes de ces enzymes au sein du génome de *M. nodulans*. L'induction de ces enzymes permettrait aux composés glycosilés exsudés d'être inducteurs.

Pour expliquer la spécificité d'association de *M. nodulans* avec les trois espèces de crotalaires, *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii* et *C. podocarpa*, nous avons vérifié l'hypothèse d'une toxicité de la rhizosphère de ces espèces envers les bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Les exsudats racinaires de *C. podocarpa*, dans nos conditions expérimentales, ne sont pas toxiques envers les *Bradyrhizobium*. Par ailleurs, une augmentation de la densité bactérienne de *M. nodulans* en présence de ces derniers est constatée. Ceci pourrait constituer un avantage

sélectif pour *M. nodulans* par rapport aux autres bactéries présentes dans la rhizosphère puisque qu'il a été montré que l'expression des gènes *nod* est dépendante de la densité bactérienne.

De plus, nous avons réalisé une étude de la spécificité de nodulation et de fixation d'azote chez 10 espèces de crotalaires. Cette étude révèle trois groupes de spécificité (GI à GIII) : GI exclusivement nodulées par *M. nodulans*, GII rassemble les espèces nodulées efficacement par des bactéries du genre *Bradyrhizobium*, et forment des pseudonodules (nodules de structures identiques mais exempt de bactérie) avec *M. nodulans*, et G3 exclusivement nodulée par les bactéries du genre *Bradyrhizobium*. La présence de pseudonodules, combinée aux données de capacité d'induction des flavonoïdes, et à la littérature sur l'identification des flavonoïdes à partir d'extraits de plante entière nous font émettre l'hypothèse que, la non-réussite de la mise en place d'une symbiose efficace entre les crotalaires du groupe GII et *M. nodulans*, relève d'un problème au niveau du processus d'infection (entrée des bactéries dans le primordium nodulaire) et non de pré-infection (mise en place du dialogue moléculaire), tandis que pour les groupe GI et GIII, il s'agit bien d'une non reconnaissance des partenaires.

Perspectives

- ✓ Pour conclure quant à l'hypothèse de toxicité il serait nécessaire de vérifier par CCM et/ou CLHP la présence de composés toxiques, notamment des alcaloïdes pyrrolizidiniques, dans les exsudats racinaires de *C. podocarpa*. Nous n'avons en effet aucune preuve que ces composés soient exsudés lors des conditions expérimentales utilisées.
- ✓ De même, il serait nécessaire de réaliser une étude comparative des exopolysaccharides, facteurs déterminants dans la réussite du processus d'infection, des différents groupes de spécificité de nodulation des crotalaires.
- ✓ Une étude de caractérisation des exsudats racinaires de différentes espèces représentantes des groupes de spécificité peut également être envisagée à la recherche d'une ou des molécule(s) spécifique(s) de nature flavonoïdique selon les groupes de spécificité.

Nous avons débuté cette étude sur 7 espèces de crotalaires précédemment étudiées. Du fait des conditions expérimentales, nous avons seulement pu mettre en évidence l'existence d'un pic commun à l'ensemble des espèces des crotalaires des groupes GI, GII et GIII, dont la signature spectrale laisse envisager la présence de deux composés co-élus, l'un de nature flavonoïdique se rapprochant de l'apigénine 7-*O*-glucoside (λ_{max} 268 et 333 nm) ou de

l'acacétine 7-*O*-glucoside (λ_{max} 268 et 324 nm) et un second d'absorbance plus importante, dont la λ . maximale situe autour de 312 nm. Outre l'identification de ce composé commun par CL-SM, l'enjeu majeur serait de produire une quantité plus importante des exsudats racinaires des différentes espèces étudiées afin de réaliser (i) des tests d'induction du gène *nodA* de *M. nodulans* avec les exsudats racinaires de différentes espèces et (ii) des analyses par CLHP, CL-SM, RMN ^1H et ^{13}C de chacun des pics/composés d'intérêt afin de déterminer leur nature et leur structure. Toutefois, et ce de façon générale, l'obstacle principal aux études portant sur le dialogue moléculaire, est de préalablement purifier et isoler une importante quantité de composés puisque, à titre d'exemple, 3 à 5 mg par analyse RMN d'un flavonoïde pur est en effet nécessaire pour en déterminer la structure.

IV. Valorisation des résultats et applications potentielles

Comprendre pourquoi la bactérie méthylotrophe *Methylobacterium nodulans* n'entre en symbiose qu'avec un nombre très restreint d'espèces de *Crotalaria* et expliquer la raison pour laquelle les quelques représentants du genre *Methylobacterium* symbiotiques s'associent avec les plantes de la tribu des *Crotalariaeae*, représentent deux enjeux majeurs.

En effet, les réponses apportées contribueraient à la mise en place d'applications multiples de ces Légumineuses :

i/ En agriculture, comme engrais vert : en exploitant à la fois les propriétés nématostatiques de la plante et les propriétés de dépollution des *Methylobacterium*, proposant ainsi une alternative aux engrais azotés et aux nématicides chimiques (Germani & Plenchette, 2004 ; Jourand et *al.*, 2004b et c).

ii/ Dans le domaine des biotechnologies : la présence de la bactérie stimulant la production des métabolites secondaires de ces plantes, - notamment les flavonoïdes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires valorisables dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et des cosmétiques-, le développement de cultures hydroponiques (Verpoorte et *al.*, 1999 ; Bourgaud et *al.*, 2001) permettrait de produire et récupérer ces molécules en continu sans destruction de la plante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Remarque : dans cette partie ne sont détaillées que les méthodologies non relatées dans les articles 1 et 2 dont les parties « Matériel et Méthodes » sont directement incluses dans le texte.

I. Matériel

I.1. Matériel microbiologique

I.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées au cours de cette étude sont : *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (Jourand et al., 2004a), *M. nodulans* ORS 2060 pmnoda-LacZ, *Bradyrhizobium* sp. ORS 1810 (Samba et al., 1999). Ces souches proviennent de la collection de microorganismes du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM, Montpellier, France). Les souches sont conservées à -80°C dans du milieu Yeast-Mannitol contenant 20 % (v/v) de glycérol.

I.1.2. Milieux de culture

Tous les milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

Milieu Yeast Mannitol (Vincent, 1970)

Le milieu YM est utilisé pour la culture des différentes souches de *Methylobacterium* et de *Bradyrhizobium*. Il contient par litre : mannitol : 10 g ; glutamate de sodium : 0,5 g ; K₂HPO₄ : 0,5 g ; MgSO₄.7H₂O : 0,2 g ; NaCl : 0,05 g ; CaCl₂ : 0,04 g ; FeCl₃ : 0,004 g ; extrait de levure : 1 g. Le pH du milieu est ajusté à 6,8. Le milieu gélosé YMA est obtenu en ajoutant 20 g/l d'agar.

Milieu M72 (Green, 1991)

Le M72 est un milieu minéral minimum utilisé pour la culture des souches de *Methylobacterium* afin de tester leur capacité à utiliser une source de carbone. Il contient par litre : K₂HPO₄ : 1,2 g ; KH₂PO₄ : 0,62 g ; CaCl₂.6H₂O : 0,05 g ; MgSO₄.7H₂O : 0,2 g ; NaCl : 0,1 g ; FeCl₃.6H₂O : 1 mg ; (NH₄)₂SO₄ : 0,5 g ; oligo-éléments : 1 ml.

La solution d'oligo-éléments est composée par litre de : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 5 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 7 mg ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 10 mg ; H_3BO_3 : 10 mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 70 mg ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 5 mg. Le pH du milieu est ajusté à 7,0. Après la stérilisation, le milieu est refroidi à 45°C.

Antibiotiques ajoutés dans les milieux de culture

Après autoclavage, on ajoute stérilement, dans chaque milieu, le ou les antibiotiques pour lesquels les souches bactériennes cultivées correspondantes sont résistantes. Pour les *Methylobacterium* sauvages, on ajoute de l'acide nalidixique à la concentration finale de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pour *Escherichia coli* pCM132, on utilise la kanamycine à 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ et pour *E. coli* BW20767, on ajoute de la gentamycine à 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

I.1.3. Pré-cultures bactériennes

Les cellules bactériennes sont cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance (en milieu adéquat suivant la finalité de l'expérimentation). Elles sont ensuite centrifugées 15 min à 3000 g et le culot bactérien est lavé 3 fois avec du milieu adéquat. Le culot est ensuite repris dans 10 ml de milieu et la densité optique de la suspension bactérienne obtenue est mesurée au spectrophotomètre à 600 nm afin de connaître le volume de cette suspension à ajouter dans les Erlenmeyers ou tubes Falcon suivant la finalité de l'expérimentation.

I.2. Matériel végétal

I.2.1. Graines de *Crotalaria*

Les graines de *crotalaires* proviennent de la collection de semences de Légumineuses tropicales du LSTM et sont conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité en chambre froide à 4°C.

I.2.2. Germination

Les graines des différentes espèces utilisées dans cette étude sont scarifiées et stérilisées en surface avec de l'acide sulfurique concentré. Les temps en minutes de traitement pour les différentes espèces de plantes sont les suivants : *Crotalaria hyssopifolia* et *Crotalaria*

lathyroides, 10 min ; *Crotalaria comosa* et *Crotalaria grantiana*, 15 min ; *Crotalaria glaucoïdes*, 20 min ; *Crotalaria ochroleuca*, 25 min, *Crotalaria perrottetii*, 30 min ; *Crotalaria podocarpa* et *Crotalaria retusa*, 35 min ; *Crotalaria goreensis*, 40 min.

Après traitement, les graines sont lavées avec de l'eau distillée jusqu'à ce que toute trace d'acide soit éliminée, puis laissées à imbiber pendant une nuit dans l'eau stérile. Les graines sont ensuite incubées pour germer dans des boîtes de Pétri stériles contenant de l'eau gélosée (8 g/l d'agar) pendant 24 h (pour l'étude des exsudats racinaires) à 72 h (pour les tests de nodulation) à 30°C à l'obscurité.

I.2.3. Production d'exsudats racinaires



Figure 38. Dispositif de production des exsudats racinaires de *C. podocarpa*.

Les plantules sont ensuite transférées en boîte de 48 puits contenant 5,5 ml d'eau distillée stérile chacun (Fig. 38). Pour l'étude des exsudats racinaires en présence du partenaire bactérien, l'inoculation des plantes est réalisée avec 100 µl de culture bactérienne de *M. nodulans* ORS 2060 en phase exponentielle de croissance, préalablement débarrassée de son milieu de culture et reprise dans de l'eau distillée stérile. Cent µl d'eau distillée stérile sont ajoutés, pour obtenir un volume équivalent, pour les exsudats non inoculés. Les plantes sont cultivées dans des conditions de lumière continue (20 W/m²) à 28°C.

Après un temps de 4, 8 ou 12 jours après germination, les exsudats racinaires sont recueillis et traités. Le traitement consiste en une centrifugation à 8000 g pendant 30 min suivie d'une filtration sur 0,2 µm. Les exsudats sont ensuite réduits à sec par évaporation rotative à 40°C,

pesés et repris par un volume minimal d'eau stérile. Avant utilisation (analyse CLHP ou test d'induction), les échantillons concentrés d'exsudats sont filtrés sur 0,2 μm .

I.2.4. Tests de nodulation

Les plantules sont transférées en pots dit « pots à muguet » contenant un mélange d'attapulgite et de perlite (50/50 ; v/v) préalablement stérilisé par autoclavage.

L'inoculation des plantes est réalisée 48 heures après la mise en pot, avec 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, préalablement débarrassée de son milieu de culture et reprise dans de l'eau distillée stérile. Les plantes sont cultivées dans des conditions de lumière continue (20 W/m²) à 28°C.

II. Méthodes

II.1. Histologie

II.1.1. Détection de l'activité β -gal *in planta*

Les coupes épaisses (30 à 40 μm) sont réalisées sur des tissus frais inclus dans de l'agarose 3% (m/v) à l'aide d'un vibratome VT1000E (Leica). Les coupes subissent ensuite un traitement pour révéler la présence de l'activité β -gal dans les tissus des nodules. Les coupes sont plongées dans un bain contenant 1 ml de tampon Z (décrit ci-après) et 200 μl de solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) à 5 mg.ml⁻¹ dans N,N-diméthylformamide. La réaction se développe 1 h à 37°C. La présence de β -gal va engendrer l'hydrolyse du composé X-gal libérant le 5-bromo-4-chloro-3-indole composé coloré en bleu. Les coupes sont observées au microscope optique (objectif 10X ou 40X) (Leica) et des photos sont prises par caméra numérique couplée au microscope. La numérisation se fait par le logiciel Soft Imaging System Analysis.

II.1.2. Colorations

Les nodules frais sont déshydratés par bains successifs de 15 minutes dans de l'éthanol 10%, 30%, 50%, 75%, 95% puis trois fois 100%. Les échantillons déshydratés sont inclus dans une

résine Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Allemagne) selon instructions du fabricant. Les coupes fines (3 à 6 μ m) sont réalisées sur bloc de résine à l'aide d'un microtome MT355S (Leica).

Les méthodes de colorations utilisées (réactions à l'acide périodique de Schiff, calcofluor, bleu de toluidine, le rouge de ruthénium et l'iodure de potassium (Sigma)) pour la microscopie optique, ainsi que les techniques de microscopie électronique sont réalisées suivant les protocoles établis par Bartholomew et *al.* (1981).

II.2. Flavonoïdes

Les solutions mères des différents flavonoïdes utilisés lors de l'étude sont préparées à 10 mM dans l'éthanol et non le méthanol pour ne pas interférer avec les propriétés méthylotropiques de *M. nodulans*.

II.3. Tests de croissance bactérienne en milieu complété

Dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu YM ou M72 stérile, on ajoute les différents substrats à tester aux concentrations souhaitées, puis on ajoute un volume de suspension bactérienne précédente de façon à obtenir une DO initiale de 0,05 (ou à une autre DO initiale souhaitée pour l'étude de l'induction du gène *nodA*). A chaque temps *t* de mesure, 1 ml de culture est prélevé afin de mesurer la croissance bactérienne par lecture de la densité optique au spectrophotomètre à 600 nm.

II.4. Mesure de l'activité β -galactosidase

Il s'agit d'étudier l'induction du gène *nodA* par celle de promoteur *pmnodA* couplé au gène rapporteur de la β -galactosidase. Pour mesurer l'induction sur la souche ORS2060 recombinée *pmnodA*, alors on réalise le dosage de l'activité β -gal à partir d'extraits protéiques bactériens.

Dans un tube Falcon 50 ml contenant 20 ml de milieu YM stérile, on ajoute les différents inducteurs à tester aux concentrations souhaitées, puis on ajoute un volume de suspension bactérienne précédente de façon à obtenir une DO initiale de 0,05 A.

Préparation des extraits protéiques :

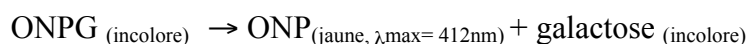
Le culot bactérien issu de 20 ml culture sur milieu YM complété avec l'inducteur à tester (flavonoïdes ou exsudats racinaires) est centrifugé à 3000 g, lavé, puis repris par 1 ml d'eau osmosée stérile. Le culot est placé dans la glace puis broyé par une sonde à ultrasons (Sonic Material 50W, Sonics, Danbury, USA), 2 fois pendant 1 min à une puissance de 30 Watts. Après traitement aux ultrasons, le culot est centrifugé 25 min à 14000 g et le dosage de l'activité β -gal et celui des protéines totales sont effectués sur le surnageant.

Dosage des protéines totales :

Ce dosage est réalisé en utilisant les réactifs du Kit Biorad DC Protein Assay 500-0112 (Biorad, France) basé sur la méthode de Folin-Lowry. Les concentrations en protéines sont exprimées en mg/ml.

Dosage de l'activité β -galactosidase :

Le dosage de cette activité enzymatique repose sur l'étude de la dégradation d'un des substrats de l'enzyme, l'*o*-nitrophényl- β -galactoside (ONPG) en 2 produits, l'*o*-nitrophénol et le galactose. Le principe du dosage est le suivant :



La quantité d'ONP formée est dosée par mesure de la densité optique (DO) par spectrophotométrie à 412 nm. Elle est mesurée à $t = 0$; $t = 15$ min, $t = 30$ min et $t = 45$ min. On en déduit la cinétique enzymatique (ou vitesse initiale d'hydrolyse de l'ONPG par la β -gal) exprimée par un coefficient de corrélation linéaire (ou pente) de la relation $\text{DO}_{(412\text{nm})} = f(t)$. Cette pente $\Delta\text{DO}/t$ s'exprime en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. La cinétique est réalisée pour des concentrations croissantes d'enzyme témoin β -galactosidase commerciale (Sigma, France). A chaque concentration en enzyme correspond une cinétique caractérisée par une pente $\Delta\text{DO}/t$ qui lui est propre. La corrélation linéaire $\Delta\text{DO}/t = f(\text{concentration en enzyme})$ sert de courbe étalon afin de calculer la quantité d'enzyme présent dans un échantillon par étude de la cinétique de formation de l'ONP.

Le dosage de l'activité est réalisé en utilisant les réactifs suivants : tampon Z (Na_2HPO_4 0,06 M ; NaH_2PO_4 , 0,04 M ; KCl, 0,01 M ; MgSO_4 , 0,001 M, β -mercapto-éthanol 0,05M ; pH ajusté à 7) ; solution A (K_2HPO_4 , 10,5 g ; KH_2PO_4 4,5 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g ; citrate de sodium,

0,5 g ; eau osmosée : 1 litre) ; solution d'ONPG (4 mg ONPG/ml de solution A) ; solution de Na_2CO_3 à 106 g/l d'eau osmosée ; solution de β -gal commerciale diluée dans l'eau osmosée à 0,01 U/ml.

Avant de commencer le dosage, toutes les solutions sont thermostatées au bain marie à 37°C. La réaction est réalisée dans 900 μl de tampon complété par 100 μl d'échantillon ou d'enzyme commerciale étalon. A $t = 0$ min, est ajouté dans chaque tube 200 μl d'ONPG. Après homogénéisation par vortex, on incube les tubes au bain marie à 37°C. A chaque temps t de mesure sont ajoutés 500 μl de Na_2CO_3 pour stopper la réaction. La DO est lue au spectrophotomètre à 412 nm.

Les cinétiques $\text{DO} = f(t)$ sont tracées pour chaque échantillon. Chaque coefficient de corrélation linéaire $\Delta\text{DO}/t$ est calculé et, par comparaison avec la courbe étalon $\Delta\text{DO}/t = f$ (concentration en enzyme), permet de déduire la concentration en enzyme de chaque échantillon.

En tenant compte de la concentration en protéines totales de l'échantillon, on en déduit l'activité spécifique β -gal, exprimée en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines ou plus simplement en $\text{U}_{(\beta\text{gal})} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines.

II.5. Techniques chromatographiques

Analyse chromatographique sur couche mince (CCM) des flavonoïdes standards et exsudats racinaires :

Les CCM sont réalisées sur plaque de silice (Merck 1.05721, TLC plates 20 x 20 cm, Silica gel 60). Les dépôts, 25 μl pour les exsudats racinaires, 2 μl pour les flavonoïdes standards, sont effectués à l'aide d'un déposeur automatique (CAMAG automatic TLC Sampler III). La migration a lieu dans la phase mobile Wagner (acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; 100:11:11:26), et la révélation se fait par le réactif de Neu (Wagner & Bladt, 1996). L'observation est réalisée sous UV aux longueurs d'onde 254 et 366 nm.

Analyse chromatographique liquide haute performance (CLHP) des flavonoïdes standards et des exsudats racinaires :

Les analyses CLHP sont réalisées au moyen d'un chromatographe « Waters 2690 separation module » couplé à une barette de diodes « Waters PDA 996 » sur une colonne semi-

préparative en phase inverse (C_{18} , 10 mm x 250 mm , 5 μ m, Gemini, Phenomenex). L'ensemble de l'appareillage est piloté par le logiciel Millennium 32 (Waters, Milford, Massachusetts, USA). Le gradient de méthanol/eau utilisé est le suivant :

Temps (min)	% méthanol
0	30
5	30
65	100
75	100
85	30
90	30

Tous les échantillons sont préalablement filtrés sur 0,2 μ m avant analyse.

II.6. Mesure de l'activité réductrice acétylène (ARA)

La mesure de l'ARA est réalisée à l'aide d'un chromatographe CPG AGILENT 6850 GC System (Agilent Technologies Europe, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une colonne capillaire Agilent 19095P-S25E (50 m x 530 μ m x 15 μ m). La détection se fait avec le détecteur FID (ionisation de flamme) du chromatographe. La température de la colonne suit pour chaque analyse un gradient de 60°C à 150°C sur 20 minutes puis un plateau à 150°C pendant 20 min. Celles de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 120°C et 250°C. Le débit du gaz vecteur (l'azote) est de 12,8 ml.min⁻¹ ceux de l'hydrogène et de l'air comprimé sont respectivement 40 ml.min⁻¹ et 400 ml.min⁻¹. Les surfaces respectives des pics des gaz acétylène et éthylène sur l'échantillon analysé sont calculées via le logiciel Agilent Chromato Gas software (Agilent Technologies Europe, Karlsruhe, Allemagne).

Les mesures ARA sont réalisées selon la méthode de Hardy *et al.* (1973) sur la plante entière : les racines de la plante sont lavées puis la plante est placée dans un flacon de verre de hermétiquement fermé de 150 ml. On prélève 15 ml d'air, puis au temps $t = 0$, on injecte 15 ml d'acétylène. A $t = 30$ min et à $t = 1$ h, on prélève à l'aide d'une seringue, 1 ml d'échantillons gazeux de gaz contenus dans la bouteille dont on injecte 0,5 ml dans un chromatographe en phase gazeuse (CPG) pour analyse. La quantité d'éthylène produite a été mesurée par le pic enregistré dont la conversion en nanomoles se fait par référence à une gamme étalon standard préalablement réalisée. L'ARA est exprimée en nmoles de C_2H_4 par unité de temps par plante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abanda-Nkpwatt D, Müsch M, Tschiersch J, Boettner M, Schwab W. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of Experimental Botany* 57, 4025-4032.

Alazard D, Duhoux E. 1990. Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. *Journal of Experimental Botany* 41, 1199-1206.

Allen ON, Allen EK. 1981. The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, USA. 812 pages.

Anesti V, Vohra J, Goonetilleka S, MacDonald IR, Straubler B, Stackebrandt E, Kelly DP, Wood AP. 2006. Validation List N° 111. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* 56, 2025-2027.

Anthony C. 1982. The biochemistry of Methylophs. Academic Press. London. England.

Aoki T, Akashi T, Ayabe S. 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research* 113, 475-488.

Ardourel M, Demont N, Debellé F, Maillet F, de Billy F, Promé JC, Dénarié J, Truchet G. 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6, 1357-1374.

Arzt J, Mount, ME. 1999. Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria* spp.) ingestion in horse on Easter Island. *Veterinary and Human Toxicology* 41, 96-99.

Aslam Z, Lee C, Kim K, Im W, Ten L, Lee S. 2007. *Methylobacterium jeotgali* sp. nov., a non-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 566.

Austin B, Goodfellow M. 1979. *Pseudomonas mesophilica*, a new species of bacteria isolated from leaf surfaces. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29, 373-378.

Austin B, Goodfellow M, Dickinson CH. 1978. Numerical taxonomy of phylloplane bacteria isolated from *Lolium perenne*. *Journal of General and Applied Microbiology* 104, 139-155.

-B-

Banfalvi F, Kondorosi A. 1989. Production of root hair deformation factors by *Rhizobium meliloti* nodulation genes in *Escherichia coli*: HsnD (NodH) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. *Plant Molecular Biology* 13, 1-12.

Banfalvi Z, Nieuwkoop A, Schell M, Besl L, Stacey G. 1988. Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular and General Genetics* 214, 420-424.

- Barker DG**, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad P, Flament P, Galuxy P, Génier G, Muel X, Toureur J, Dénarié J, Huguet T. 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 8, 40-49.
- Barnett M**, Fisher R. 2006. Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis* 42, 1-24.
- Barrett CF**, Parker MA. 2006. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus* and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* species in Costa Rica. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1198-1206.
- Barsch A**, Tellström V, Patschkowski T, Küster H, Niehaus K. 2006. Metabolite profiles of nodulated alfalfa plants indicate that distinct stages of nodule organogenesis are accompanied by global physiological adaptations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 998-1013.
- Basile DV**, Slade LL, Corpe WA. 1969. An association between a bacterium and a liverwort, *Scapania nemorosa*. *Bulletin of Torrey Botanic Club* 96, 711-714.
- Bartholomew JW**, Cantwell GE, Clark G, Coalson RE, Dougherty WJ, Kasten FH, Mohr JL, Phillips RL, Schneider H, Spicer SS. 1998. Staining procedures. Fourth edition. Ed. C. Clark. Williams et Wilkins, USA, Baltimore, 512 pages.
- Becker M**, Johnson D. 1998. The role of legume fallows in intensified upland rice-based systems of West Africa. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 53, 71-81.
- Begum AA**, Leibovitch S, Migner P, Zhang F. 2001. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany* 52, 1537-1543.
- Beijerinck**, 1888. *Botanische Zeitung* 46, 725-804. Traduit par T. Brock, 1961, *Milestones of Microbiology*, ASM Press, Washington, D.C. pp 220-222.
- Berck S**, Perret X, Quesada-Vincens D, Promé JC, Broughton WJ, Jabbouri S. 1999. NodL of *Rhizobium* sp. NGR234 is required for *O*-acetyltransferase activity. *Journal of Bacteriology* 181, 957-964.
- Bhakuni D**, Chaturvedi R. 1984. Chemical constituents of *Crotalaria madurensis*. *Journal of Natural Products* 47, 585-591.
- Bloemberg GV**, Lagas RM, van Leeuwen, S, Van der Marel GA, Van Boom JH, Lugtenberg BJ, Spaik HP. 1995. Substrate specificity and kinetic studies of nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum*. *Biochemistry*, 34, 12712-12720.
- Bloemberg GV**, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ, Spaik HP. 1994. Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* *O*-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetylglucosamine *in vitro*. *Molecular Microbiology* 11, 793-804.

Boivin C, Ndoye I, Lortet G, Ndiaye A, de Lajudie P, Dreyfus B. 1997. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. terangae* bv. *sesbania* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. Applied and Environmental Microbiology 63, 1040-1047.

Bolanos-Vasquez MC, Werner D. 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. Molecular Plant-Microbe Interactions 10, 339-346.

Boone CM, Olsthoorn MM, Dakora FD, Spaink HP, Thomas-Oates JE. 1999. Structural characterisation of lipo-chitin oligosaccharides isolated from *Bradyrhizobium aspalati*, microsymbionts of commercially important south african legumes. Carbohydrate Research 317, 155-63.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Plant Science 161, 839-851.

Bousfield IJ, Green PN. 1985. Reclassification of bacteria of the genus *Protonomas* (Urakami & Komagata, 1984) in the genus *Methylobacterium* (Patt, Cole & Hanson) emend. Green & Bousfield 1981. International Journal of Systematic Bacteriology 35, 209.

Broughton WJ, Perret X. 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. Current Opinion in Plant Biology 2, 305-311.

-C-

Cardenas L, Vidali L, Dominguez J, Perez H, Sanchez F, Hepler PK, Quinto C. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium elti* nodulation signals. Plant Physiology 116, 871-877.

Chandler M. 1978. Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. Journal of Experimental Botany 29, 749-755.

Chaturvedi R, Pant N, Garg H, Bhakuni D. 1987. Isoflavanoids of *Crotalaria madurensis*. Journal of Natural Products 50, 266-269.

Chen WM, de Faria SM, Stralioetto R, Pitard RM, Simones-Araujo JL, Chou JH, Chou YJ, Barrios E, Prescott AR, Elliott GN, Sprent JI, Young PW, James EK. 2005. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from south america. Applied and Environmental Microbiology 71, 7461-7471.

Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Bena G, Boivin-Masson C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. Journal of Bacteriology 185, 7266-7272.

Chen WP, Kuo TT. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Research 21, 22-60.

Chen X, Feng J, Hou B, Li F, Li Q, Hong G. 2005. Modulating DNA bending affects

NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. Nucleic Acids Research 33, 2540-2548.

Chistoserdova L, Chen SW, Lapidus A, Lidstrom ME. 2003. Methyлотrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. Journal of Bacteriology 185, 2980-2987.

Cho MJ, Harper JE. 1991. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild-type and nodulation-mutant soybean root. Plant Physiology 95, 435-442.

Choudhury MM, Moreira, WA, Noronha Filho JN. 1998. Control of nematodes with *Crotalaria* in irrigated banana plants. Centro de Pesquisa Agropecuaria do Tropicо Semi-arido, Petrolina, Brasil. Comunicado Tecnico 78, 1-5.

Cooper JE. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Advances in Botanical Research 41, 1-62.

Corpe WA, Basile DV. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. Development and Industrial Microbiology 23, 483-493.

Corpe WA, Rheem S. 1989. Ecology of the methyлотrophic bacteria on living leaf surfaces. FEMS Microbiology Ecology 62, 243-250.

Corvera A, Prome D, Prome JC, Martinez-Romero E, Romero D. 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. Molecular Plant-Microbe Interactions 12, 236-246.

Cren M, Kondorosi A, Kondorosi E. 1995. NolR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. Molecular Microbiology 15, 733-747.

Cullimore JV, Ranjeva R, Bono JJ. 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharide Nod factors in legumes. Trends in Plant Sciences 6, 24-30.

-D-

Daesaeger J, Rao MR. 1999. The root-knot nematode problem in *Sesbania* fallow and scope for managing it in western Kenya. Agroforestry System 47, 273-288.

Daesenger J, Rao MR. 2000. Parasitic nematode populations in natural fallows and improved cover crops and their effects on subsequent crops in Kenya. Field Crops Research 65:41-56.

Dakora FD, Joseph CM, Phillips DA. 1993a. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology 101, 819-824.

Dakora FD, Joseph CM, Phillips DA. 1993b. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. Molecular Plant-Microbe Interactions 6, 665-668.

Dakora FD, Muofhe M. 1996. Molecular signals involved in nodulation of the African

Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.). Proceedings of the International Bambara groundnut Symposium, University of Nottingham, UK, 23-25.

Dakora FD. 2000. Commonality of root nodulation signals and nitrogen assimilation in tropical grain legumes belonging to the tribe *Phaseoleae*, Australian Journal of Plant Physiology 27,10.

D'Arcy Lameta A, Jay M. 1987. Study of soybean and lentil root exudates. III: Influence of soybean isoflavonoids on the growth of rhizobia and some rhizospheric microorganisms. Plant and soil 101, 267-272.

Davis EO, Evans IJ, Johnston AW. 1988. Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate afghanistan peas. Molecular and General Genetics 212, 531-535.

Davis EO, Johnston AWB. 1990. Regulatory functions of the three *nodD* genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Molecular Microbiology 4, 933-941.

Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J, Boivin C. 2001. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. Acta Biochimica Polonica 48, 359-365.

Deleve LD, Wang X, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. 1996. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease. Hepatology 23, 589-599.

Dénarié J, Cullimore J. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell 74, 951-954.

Dénarié J, Debellé F, Promé JC. 1996. Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annual Review of Biochemistry 65, 503-535.

Dénarié J, Debellé F, Rosenberg C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annual Review of Microbiology 46, 497-531.

Dénarié J, Debellé F, Truchet G, Promé JC. 1993. Rhizobium and legume nodulation: a molecular dialogue. In New horizons in Nitrogen Fixation ed. Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. Dordrecht: Kluwer. pp 19-30.

D'Haeze W, Holsters, M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiology 12, 79-105.

D'Haeze W, Mergaert P, Promé J, Holsters M. 2000. Nod factor requirements for efficient stem and root nodulation of the tropical Legume *Sesbania rostrata*. Journal of Biological Chemistry 275, 15676-15684.

D'Haeze W, Van Montagu M, Promé JC, Holsters M. 1999. Carbamoylation of azorhizobial Nod factors is mediated by NodU. Molecular Plant-Microbe Interactions 12, 68-73.

Dhasmana H, Garg H. 1991. Lepidoside: a rare flavonol diglycoside from *Crotalaria*

semperflorens vent. Journal of the Indian Chemical Society 68, 476-477.

Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Srinivasa Reddy MS, Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence, a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3, 371-390

Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG. 1987. *Rhizobium* - the refined parasite of legumes. *Annual Review of Phytopathology* 25, 145-168.

Doignon-Bourcier F, Sy A, Willems A, Torck U, Dreyfus B, Gillis M, De Lajudie P. 1999. Diversity of bradyrhizobia from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 647-661.

Doignon-Bourcier F, Willems A, Coopman R, Laguerre G, Gillis M, De Lajudie P. 2000. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small senegales legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3987-3997.

Doronina NV, Trotsenko YA, Kuznetsov BB, Tourova TP, Salkinoja-Salonen MS. 2002. *Methylobacterium suomiense* sp. nov. and *Methylobacterium lusitanum* sp. nov., aerobic, pink pigmented, facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 773-776.

Doronina NV, Trotsenko YA, Tourova TP, Kuznetsov BB, Leisinger T. 2000. *Methylopila helvetica* sp. nov. and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov. novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilising dichloromethane. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 210-218.

Downie JA. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes, in *The Rhizobiaceae*, H.P. Spaink, Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J., Editors. Kluwer academic publishers: Dordrecht/Boston/London. pp 387-402.

Downie JA. 2007. Infectious Heresy. *Science* 316, 1296-1297.

Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 38, 89-98.

-E-

Ehrhardt DW, Morrey Atkinson E, Faull KF, Freedberg DNI, Sutherlin DP, Armstrong R, Long SR. 1992. In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. *Journal of Bacteriology* 177, 6237-6245.

Ehrhardt DW, Wais R, Long SR. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to rhizobium nodulation signals. *Cell* 85, 673-681.

Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K. 2000. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*

67, 5285-5293.

Endre G, Kereszt A, Kevel Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417, 962-966.

Esparrago G, Barreiro JM, Ruales C. 1999. Comparison of *Meloidogyne* populations on roots of *Crotalaria spectabilis* and processing tomato varieties with *Mi* gene. *Acta Horticultura* 487, 267-270.

-F-

Faria SM, Lewis, GP, Sprent J, Sutherland JM. 1989. Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist* 111, 607-619.

Felle H, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M. 1995. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* 13, 455-463.

Fernandez-Lopez M, D'Haese W, Mergaert P, Verplancke C, Promé JC, Van Montagu M, Holsters M. 1996. Role of *nodI* and *nodJ* in lipo-chitoooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 20, 993-1000.

Finan T, Hirsch A, Leigh J, Johansen E, Kuldau G, Deegan S, Walker G, Signer E. 1985. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell* 40, 869-877.

Firmin JL, Wilson KE, Carlson RW, Davies AE, Downie JA. 1993. Resistance to nodulation of cv. afghanistant peas is overcome by *nodX*, which mediates *O*-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Molecular Microbiology* 10, 351-360.

Firmin J, Wilson K, Rossen L, Johnston A. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324, 90-92.

Fischler M, Wortmann C, Feil B. 1999. *Crotalaria* (*C. ochroleuca* G. Don.) as a green manure in maize-bean cropping systems in Uganda. *Field Crops Research* 61, 97-107.

Fisher RF, Egelhoff TT, Mulligan JT, Long SR. 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing *NodD* to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes and Development* 2, 282-293.

Fisher R, Long S. 1992. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* 357, 655-660.

Folch-Mallol JL, Marroqui S, Sousa C, Manyani H, Lopez-Lara IM, Van der Drift KM, Haverkamp J, Quinto C, Gil-Serrano A, Thomas-Oates J, Spaink HP, Megias M. 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 151-163.

Foucher F, Kondorosi E. 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43, 773-786.

-G-

Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 280-300.

Gagnon H, Ibrahim RK. 1998. Aldonic acids: a novel family of nod gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 988-998.

Gallego V, Garcia M, Ventosa A. 2006. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 339-342.

Gallego V, Garcia M, Ventosa A. 2005a. *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 281-287.

Gallego V, Garcia M, Ventosa A. 2005b. *Methylobacterium isbiliense* sp. nov., isolated from the drinking water system of Sevilla, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2333-2337.

Gallego V, Garcia M, Ventosa A. 2005c. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from an aquatic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1429-1433.

Gao JL, Sun G, Li Y, Wang ET, Chen WX. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 151-158.

Geelen D, Mergaert P, Geremia RA, Goormachtig S, Van Montagu M, Holsters M. 1993. Identification of *nodSUIJ* genes in Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Molecular Microbiology* 9, 145-154.

Gehring C, Irving H, Kabbara A, Parish R, Boukli N, Broughton W. 1997. Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced root-hair deformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 791-802.

Geremia, RA, Mergaert P, Geelen D, Van Montagu M, Holsters M. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91, 2669-2673.

Germani G, Plenchette C. 2004. Potential of *Crotalaria* species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 266, 333-342.

Gilardi GL, Faur, YC. 1984. *Pseudomonas mesophilica* and an unnamed taxon. Clinical isolates of pink-pigmented oxidative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 20, 626-629.

- Gillette WK**, Elkan GH. 1996. *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. strain NC92 contains two *nodD* genes involved in the repression of *nodA* and a *nolA* gene required for the efficient nodulation of host plants. *Journal of Bacteriology* 178, 2757-2766.
- Giraud E**, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky M. 2007. Legumes Symbioses: Absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316, 1307-1312.
- Godfrey GH**. 1928. Legumes as rotation and trap crops in pineapple fields. Experiment Station of the Association of Hawaiian Pineapple Cannery Bulletin 10, 3-21.
- Goedhart J**, Bono JJ, Bisseling T, Gadella TWJ. 2003. Identical accumulation and immobilization of sulfated and nonsulfated Nod factors in host and nonhost root hair cell walls. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16, 884-892.
- Gongaza V**, Ferraz S. 1994. Control of *Meloidogyne incognita* race 3 by some plant species with or without incorporation of the above ground plant parts into the soil. *Nematologica Brasileira* 18, 42-49.
- Gordon AJ**, Minchin FR, James CL, Komina O. 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* 120, 867-878.
- Graham PH**, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131, 872- 877.
- Green PN**. 1991. The genus *Methylobacterium*.. In: The procaryotes. Albert Balows, H. G. T., Martin Dworkin, Wim Harder, and Karl-Heinz Schleifer (eds.). Springer-verlag, pp2342-2349.
- Green PN**. 1992. The genus *Methylobacterium*. In: The Prokaryotes 2nd edn, vol III. Edited by Balows A., Trüper H.G, Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. Springer-Verlag Edition. New-York, USA, pp 2342-2349.
- Green PN**, Bousfield IJ. 1983. Emendation of *Methylobacterium* (Patt, Cole & Hanson, 1976); *Methylobacterium rhodinum* (Heumann, 1962) comb. nov. corrig; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizula, 1971) comb. nov. corrig; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow, 1979) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33, 875-877.
- Green PN**, Bousfield IJ, Hood D. 1988. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov. and *M. fujisawaense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 124-127.
- Gyorgypal Z**, Kiss GB, Kondorosi A. 1991. Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD proteins. *Bioessays* 13, 575-581.

-H-

Handberg K, Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal* 2, 487-496.

Hanin M, Jabbouri S, Quesada-Vincens D, Freiberg C, Perret X, Promé JC, Broughton WJ, Fellay R. 1997. Sulphation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors is dependent on *noeE*, a new host-specificity gene. *Molecular Microbiology* 24, 1119-1129.

Hanson RS, Hanson TE. 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews* 2, 439-471.

Hardy RWF, Burn RC, Holsten RD. 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂ fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 47-87.

Hartwig U, Maxwell C, Joseph C, Phillips D. 1990. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 92, 116-122.

Hartwig UA, Phillips DA. 1991. Release and modification of nod-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiology* 95, 804-807

Heumann W. 1962. Die Methodik der Kreuzung sternbildender Bakterien. *Biologisches Zentralblatt* 81, 341-354.

Hiraischi A, Furuhashi K, Matsumoto A, Koike KA, Fukuyama M, Tabuchi K. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2099-2107.

Hirsch AM, 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122, 211-237.

Hirsch AM, Lum MR, Downie JA. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology* 127, 1484-1492.

Hohnjec N, Becker J, Pühler A, Perlick A, Küster H. 1999. Genomic organization and expression properties of the *MtSucSI* gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*. *Molecular Genetics and Genomics* 261, 514-522.

Holland MA. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent Research and Development in Plant Physiology* 1, 207-213.

Holland MA, Polacco JC. 1994. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Plant Physiology* 45, 197-209

Holland MA, Stebbins NE, Polacco JC. 1992. Evidence of interactions in nitrogen metabolism between soybean and phylloplane bacterium. *Plant Physiology* 99, 30-31.

Hopkins WG. 2003. Introduction to plant physiology. Second edition. Eds : De Boeck, De Boeck University, Belgique, pp 68-101.

Hornei B, Lüneberg E, Schmidt-Rotte H, Maab M, Weber K, Heits F, Frosch M, Solbach W. 1999. Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. Journal of Clinical Microbiology 37, 248-250.

Huang CS, Charchar JM, Tenente RCV. 1981. Control of root-knot nematode in carrot through rotation. Fitopatologia Brasileira 3, 329-336.

Hungria M, Joseph C, Phillips D. 1991a. Anthocyanidins and flavonols, major nod gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiology 97, 751-758.

Hungria M, Joseph C, Phillips D. 1991b. *Rhizobium* nod gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiology 97, 759-764.

Hungria M, Johnston A, Phillips D. 1992. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Mol Plant-Microbe Interactions 5, 199-203.

-I-

Innes R, Kuempel P, Plazinski J, Canter-Cremers H, Rolfe B, Djordjevic M. 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. Molecular Genetics and Genomics 201, 426-432.

Ito H, Lizuka H. 1971. Part. III. Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*. Journal of Agricultural Biology and Chemistry 35, 1566-1571.

Ivanova EG, Doronina NV. 2001. Aerobic methylobacteria are capable to synthesize auxins. Microbiology 70, 392-397.

Ivanova EG, Doronina NV, Shepeliakovskaia AO, Laman AG, Brovko FA, Trotsenko YA. 2000. Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. Mikrobiologika 69, 764-769.

-J-

Jabbouri S, Fellay R, Talmont F, Kamalaprija P, Burger U, Relic B, Promé JC, Broughton WJ. 1995. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-*O*-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors. Journal of Biology and Chemistry 270, 22968-22973.

Jabbouri S, Relic B, Hanin M, Kamalaprija P, Burger U, Promé D, Promé JC, Broughton WJ. 1998. *nolO* and *noeI* (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-*O*-carbamoylation and 2-*O*-methylation of Nod factors. Journal of Biology and Chemistry 273, 12047-12055.

Jaftha JB, Strijdom BW, Steyn PL. 2002. Characterisation of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. Systematic and Applied Microbiology 25, 440-449.

Jain V, Nainawatee H. 1999. Flavonoids influence growth and saccharide metabolism of

Rhizobium meliloti. Folia microbiologica 44, 311-316.

Jain V, Nainawatee HS. 2002. Plant flavonoids: Signals to legume nodulation and soil microorganisms. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 11, 1-10.

Jasy T, Koshy PK. 1992. Effect of certain leaf extracts and leaves of *Glycirida maculata* (H.B. & K.) Steud. as green manure on *Radopholus similis*. Indian Journal of Nematology 22, 117-121.

Jones K, Kobayashi H, Davies B, Taga M, Walker G. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nature Reviews Microbiology 5, 619-633.

Jourand P. 2003. Les Légumineuses du genre *Crotalaria* : symbiose fixatrice d'azote et activités biologiques contre les nématodes phytoparasites. Doctorat de l'Université Montpellier II. Formation doctorale: développement et adaptation des plantes. Ecole doctorale: Biologie integrative, 183 pages.

Jourand P, Giraud E, Bena G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, De Lajudie P. 2004a. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule forming and nitrogen-fixing bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2269-2273.

Jourand P, Rapior S, Fargette M, Mateille T. 2004b. Nematostatic effects of a leaf extract from *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots. Nematology 6, 79-84.

Jourand P, Rapior S, Fargette M, Mateille T. 2004c. Nematostatic activity of aqueous extracts of West African *Crotalaria* species. Nematology, 6, 765-771.

Jourand P, Renier A, Rapior S, Miana de Faria S, Prin Y, Galiana A, Giraud E, Dreyfus B. 2005. Role of methylotrophy during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. Molecular Plant-Microbe Interactions 18, 1061-1068.

-K-

Kahn M, MacDermott T, Udvardi M. 1998. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. The *Rhizobiaceae*. HP Spaink, A. Kondorosi, and PJJ Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 461-483.

Kaminski PA, Batut J, Boistard P. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. The *Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 431-460.

Kamst E, Bakkers J, Quaedvlieg NE, Pilling J, Kijne JW, Lugtenberg BJ, Spaink HP. 1999. Chitin oligosaccharide synthesis by rhizobia and zebrafish embryos starts by glycosyl transfer to O4 of the reducing-terminal residue. Biochemistry 38, 4045-4052.

Kamst E, Breek CK, Spaink HP. 2000. Functional analysis of chimeras derived from the *Sinorhizobium meliloti* and *Mesorhizobium loti nodC* genes identifies regions controlling chitin oligosaccharide chain length. Molecular and General Genetics 264, 75-81.

Kamst E, Pilling J, Raamsdonk LM, Lugtenberg BJ, Spaink HP. 1997. Rhizobium nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 179, 2103-2108.

Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EM, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, Jensen TH, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. 2006. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 359-364.

Kape R, Parniske M, Brandt S, Werner D. 1992. Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1705-1710.

Kayle KM, Macone A, Kazanjian PH. 1992. Catheter infection caused by *Methylobacterium* in immunocompromised hosts: report of three cases and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 14, 1010-1014.

Kim S, Copeland L. 1996. Enzymes of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in soybean and chickpea bacteroids. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4186-4190.

Kinghorn AD, Smolenski SJ. 1981. Alkaloids of *Papilionoideae*. In: *Advances in Legume Systematics*. Polhill R.M. & Raven P.H. Royal Botanic Gardens, Kew, England, pp 585-589.

Kleinig H, Broughton W. 1982. Carotenoid pigments in a red strain of *Rhizobium* from *Lotononis bainesii* Baker. *Archives of Microbiology* 133, 164-164.

Ko H, Weng J, Tsao L, Yen M, Wang J, Lin C. 2004. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14, 1011-1014.

Korotkova N, Lidstrom M. 2001. Connection between Poly-hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C1 and C2 compounds in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* 183, 1038-1046.

Kosslak R, Bookland R, Barkei J, Paaren H, Appelbaum E. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from glycine max. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 7428-7432.

Kosslak R, Joshi R, Bowen B, Paaren H, Appelbaum E. 1990. Strain-specific inhibition of nod gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1333-1341.

Krishnan H, Lorio J, Kim W, Jiang G, Kim K, DeBoer M, Pueppke S. 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA 257. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 167, 617-625.

Krishnan HB, Pueppke SG. 1991. Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 512-520.

Krohn K, Steingrover K, Srinivasa Rao M. 2002. Isolation and synthesis of chalcones with different degrees of saturation. *Phytochemistry* 61, 931-936.

-L-

Lawson CGR, Rolfe BG, Djordjevic MA. 1996. *Rhizobium* inoculation induces condition-dependent changes in the flavonoid composition of root exudates from *Trifolium subterraneum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 23, 93-101.

Lee SE, Seo DH, Park HL, Choi YJ, Jung SH. 2003. Solubility enhancement of a hydrophobic flavonoid, luteolin by the complexation with cyclophorases isolated from *Rhizobium meliloti*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 201-207.

Leigh J, Signer E, Walker G. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82, 6231-6235.

Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57, 405-430.

Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.

Lewin A, Cervantes E, Chee-Hoong W, Broughton WJ. 1990. *NodSU*, two new nod genes of the broad host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3, 317-326.

Lewin AC, Rosenberg C, Meyer ZA, Wong CH, Nelson L, Manen JF, Stanley J, Dowling DN. 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular and Biology* 8, 447-459.

Lidstrom ME, Chistoserdova L. 2002. Plants in the pink: cytokinin production by *Methylobacterium*. *Journal of Bacteriology* 184, 1818-1841.

Limpens E, Bisseling T. 2003. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 343-350.

Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 630-633.

Lin C, Chen Y, Song S, Lin L. 1999. Flavonoids as inducers of extracellular proteins and exopolysaccharides of *Sinorhizobium fredii*. *Biology and Fertility of Soils* 30, 83-89.

Lodwig E, Leonard M, Marroqui S, Wheeler T, Findlay K, Downie J, Poole P. 2005. Role of

polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 67-74.

Loh J, Garcia M, Stacey G. 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journl of Bacteriology* 179, 3013-3020.

Loh J, Lohar DP, Andersen B, Stacey G. 2002. A two component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Journal of Bacteriology* 184, 1759-1766.

Loh JT, Stacey G. 2001. Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Molecular Microbiology* 41, 1357-1364.

Long SR. 1996. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8, 1885-1898.

Lopez-Lara IM, Blok-Tip L, Quinto C, Garcia ML, Stacey G, Bloemberg GV, Lamers GE, Lugtenberg BJ. 1996. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. *Molecular Microbiology* 21, 397-408.

Lopez-Lara IM, Geiger O. 2001. The nodulation protein NodG shows the enzymatic activity of an 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 349-357.

Lopez-Lara IM, Kafetzopoulos D, Spaink HP, Thomas-Oates JE. 2001. Rhizobial NodL O-acetyl transferase and NodS N-methyl transferase functionally interfere in production of modified Nod factors. *Journal of Bacteriology* 183, 3408-3416.

Lopez-Lara IM, Van Den Berg JDJ, Thomas-Oates JE, Glushka J, Lugtenberg BJJ, Spaink HP. 1995. Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Molecular Microbiology* 15, 627-638.

-M-

Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, Heidelberg-New York, 354 pages.

Mac Beth CW, Taylor AL. 1944. Immune and resistant cover crops valuable in root-knot infested peach orchards. *Proceeding American Horticultural Society* 45, 158-166.

Mac Donald IR, Doronina NV, Trotsenko YA, Mac Anulla C, Murrel JC. 2001. *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilising bacteria isolated from a polluted environment. *International Journal of Systematic Bacteriology* 51, 119-122.

Madhaiyan M, Kim B, Poonguzhali S, Kwon S, Song M, Ryu J, Go S, Koo B, Sa T. 2007a. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 326.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. 2007b. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). *Planta* 226, 867-876.

Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. 2003. A receptor kinase gene of LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425, 637-640.

Manyani H, Sousa C, Soria-Diaz ME., Gil-Serrano A, Megias M. 2001. Regulation of Nod factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 574-579.

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press, London, 889 pages.

Marx JC, Lidstrom ME. 2001. Development of improved versatile broad-host-range vectors for uses in methylotrophs and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 147, 2065-2075.

Maxwell C, Hartwig U, Joseph C, Phillips D. 1989. A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 91, 842-847.

Mears JA, Mabry TJ. 1971. Alkaloids in *Leguminosae*. In: Chemotaxonomy of the *Leguminosae*. Harborn J.B., Boulter D. & Turner B.L. Academic Press, England, London, pp 73-178.

Mergaert P, D'Haeze W, Fernández-Lopez M, Geelen D, Goethals K, Promé, JC, Van Montagu M, Holsters M. 1996. Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nolK*, *nodZ*, as well as *noeC* and/or downstream genes. *Molecular Microbiology* 21, 409-419.

Mergaert P, Ferro M, D'Haeze W, Van Montagu M, Holsters M, Promé, JC. 1997a. Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 683-687.

Mergaert P, Montagu MV, Holsters M. 1997b. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology* 25, 811-817.

Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset A, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A. 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 5230-5235.

Mergaert P, Van Montagu M, Holsters M. 1997c. The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *FEBS Letters* 409, 312-316.

Messens E, Geelen D, Van Montagu M, Holsters M. 1991. 7, 4'-Dihydroxyflavanone is the

major *Azorhizobium* nod gene-inducing factor present in *Sesbania rostrata* seedling exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 262-267.

Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6, 414-419.

Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Minami E, Kouchi H, Carlson RW, Cohn JR, Kolli VK, Day RB, Ogawa T, Stacey G. 1996. Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of the early nodulin, Enod2, in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 574-583.

Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GE, Long SR. 2004. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 4701-4705.

Moreira F, Cruz L, Miana de Faria S, Marsh T, Martínez-Romero E, de Oliveira Pedrosa F, Maria Pitard R, Peter W Young J. 2006. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systemic and Applied Microbiology* 29, 197-206.

Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C, Stepkowski T. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 720-732.

Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C, 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. *Nature* 411, 948-950.

Moura RM. 1991. Two years of crop rotation on sugarcane field to control root-knot. Part 1 : effect of treatment on the nematode population. *Nematologia Brasileira* 15, 1-7.

Mulligan J, Long S. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti* *nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 6609-6613.

Mulligan J, Long S. 1989. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics* 122, 7-18.

Musanje E, Joshi J, Kittel M, Holland M. 1996. Abstract, 6th biennial conference on molecular and cellular biology of soybean. University of Missouri, Columbia, MO, USA.

-N-

Nair AG, Seetharaman TR, Krishnaraju J. 1988. Anacrotine and flavone-C-glycosides from the aerial parts of *Crotalaria angulata*. *Fitoterapia*.

N'Doye I, de Billy F, Vasse J, Dreyfus B, Truchet G. 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *Journal of Bacteriology* 176, 1060-1068.

Neal WN, Rusoff LL, Ahmann CF. 1935. The isolation and some properties of an alkaloid from *Crotalaria spectabilis* Roth. Journal of American Chemical Society 57, 2560-2561.

Niehaus K, Kapp D, Pühler A. 1993. Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. Planta, 190, 415-425.

Norris DO. 1958. A red strain of *Rhizobium* from *Lotononis bainesii* Baker. Australian Journal of Agricultural Science, 202-207.

Nunn DN, Day D, Anthony C. 1989. The second subunit of methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1. Biochemical Journal 260, 857-862.

-O-

Obendorf R, Koch J, Gorecki R, Amable R, Aveni M. 1990. Methanol accumulation in maturing seeds. Journal of Experimental Botany 41, 489-495.

Oldroyd GED. 2001. Dissecting symbiosis: Developments in Nod factor signal transduction. Annals of Botany 87, 709-718.

Oldroyd G, Downie J. 2006. Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signaling. Current Opinion in Plant Biology 9, 351-357.

Omer ZS, Tombolini R, Gerhardson B. 2004. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). FEMS Microbiology and Ecology 46, 319-326.

Ovtsyna AO, Rademaker GJ, Esser E, Weinman J, Rolfe BG, Tikhonovich IA, Lugtenberg BJJ, Thomas-Oates JE. 1999. Comparison of characteristics of the *nodX* genes from various *Rhizobium leguminosarum* strains. Molecular Plant-Microbe Interactions 12, 252-258.

Ovtsyna AO, Schultze M, Tikhonovich IA, Spaink HP, Kondorosi E, Kondorosi A, Staehelin C. 2000. Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed *in vitro* by plant chitinases at different rates. Molecular Plant-Microbe Interactions 13, 799-807.

-P-

Paau A, Cowles J, Raveed D. 1978. Development of bacteroids in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules. Plant Physiology 62, 526-530.

Patel NM, Patel DJ, Patel NR, Patel SK, Patel JA. 1988. Effect of summer cropping in conjunction with nematicidal treatment on yield and root-knot disease of bidi tobacco. Tobacco Research 14, 1-7.

Patriarca EJ, Tate R, Ferraioli S, Iaccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. International Review of Cytology 234, 201-262.

- Patt TE**, Cole GC, Hanson RS. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 26, 226-229.
- Pawlowski K**, Bisseling T. 1996. Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? Plant Cell. 8, 1899-1913.
- Peck MC**, Fisher RF, Long SR. 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. Journal Bacteriology 188, 5417-5427.
- Perret X**, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 180–201.
- Peters N**, Frost J, Long S. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science 233, 977.
- Peters N**, Long S. 1988. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Plant Physiology 88, 396-400.
- Peters NK**, Verma DP. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations. Molecular Plant Microbe Interactions 3, 4-8.
- Phillips D**. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Annual review 31, 29-49.
- Phillips DA**, Joseph CM, Maxwell CA. 1992. Trigonelline and stachydrine released from Alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology 99, 1526-1531.
- Plazinski J**, Ridge RW, McKay IA, Djordjevic MA. 1994. The *nodDABC* genes of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* confer root-hair curling ability to a diverse range of soil bacteria and the ability to induce novel root swellings on beans. Australian Journal of Plant Physiology 21, 311 – 325.
- Poinsot V**, Belanger E, Laberge S, Yang GP, Antoun H, Cloutier J, Treilhou M, Dénarié J. 2001. Unusual methyl-branched alpha,beta-unsaturated acyl chain substitutions in the Nod factors of an arctic rhizobium, *Mesorhizobium* sp strain N33 (*Oxytropis arctobia*). Journal of Bacteriology 183, 3721-3728.
- Polacco JC**, Holland MA. 1993. Roles of urease in plant cells. In: Jeon K.W. & Jarvik K., International Review of Cytology, Academic Press Inc., San-Diego, CA, USA, 145, 65-103.
- Polhill RM**. 1982. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. Balkema. Rotterdam. The Netherlands. 389 pages.
- Polhill RM**, Raven PH. 1981. Advances in Legume Systematics. Royal Botanic Garden, Kew, England, 1049 pages.
- Poole P**, Allaway D. 2000. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. Advance in Microbial Physiology 43, 117-63.
- Posada D**, Crandall KA, 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution.

Bioinformatics 14, 817-8.

Prade RA, Zhan D, Ayoubi P, Mort A. 1999. Pectins, Pectinases, and Plant-Microbe Interactions. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 16, 361-391.

Pueppke SG, Broughton WJ. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 293-318.

-Q-

Quesada-Vincens D, Fellay R, Nasim T, Viprey V, Burger U, Prome JC, Broughton WJ, Jabbouri S. 1997. *Rhizobium* sp. strain NGR234 NodZ protein is a fucosyltransferase. *Journal of Bacteriology* 179, 5087-5093.

Quesada-Vincens D, Hanin M, Doignon-Bourcier F. 1998. *In vitro* sulfotransferase activity of NoeE, a nodulation protein of *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 592-600.

-R-

Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. 2003. Plant recognition of symbiotic requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585-592.

Rao MS, Rao PS, Toth G, Balazs B, Duddeck H. 1998. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria ramosissima*. *Journal of Natural Product* 61, 1148.

Recourt K, Schripsema J, Kijne J, Brussel A, Lugtenberg B. 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of nod gene activating flavanones and chalcones. *Plant Molecular Biology* 16, 841-852.

Redmond J, Batley M, Djordjevic M, Innes R, Kuempel P, Rolfe B. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323, 632-635.

Relic B, Perret X, Estrada-Garcia MT, Kopcinska J, Golinowski W, Krishnan HB, Pueppke SG, Broughton WJ. 1994. Nod factors are a key to the legume door. *Molecular Microbiology* 13, 171-178.

Renier A, Jourand P, Rapior S, Poinot V, Sy A, Dreyfus B, Moulin L, 2008. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T: a classic process for an atypical symbiont. *Soil Biology and Biochemistry*.

Rich JR, Rahi GS. 1995. Suppression of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* on tomato with ground seed castor, *Crotalaria*, hairy indigo and wheat. *Nematropica* 25, 159-164.

Ritsema T, Geige O, Van Dillewijn P, Lugtenberg BJ, Spaink HP. 1994. Serine residue 45 of nodulation protein NodF from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for its biological function. *Journal of Bacteriology* 176, 7740-7743.

Ritsema T, Wijffjes AHM, Lugtenberg BJJ Spaink HP. 1996. Rhizobium nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Molecular and General Genetics* 251, 44-51.

Rivas R, Velasquez E, Willems A, Vizcaino N, Subba-Rao NS, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, Martinez-Molina E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5217-5222.

Rivilla R, Sutton JM, Downie JA. 1995. *Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer-membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE and AprF. *Gene* 161, 27-31.

Roche P, Debéllé F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J, Promé, JC. 1991a. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67, 1131-1143.

Roche P, Lerouge P, Ponthus C, Promé C. 1991b. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti* alfalfa symbiosis. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10933-10940.

Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debéllé F, Ferro M, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1996. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 15305-15310.

Rohrig H, Schmidt J, Wieneke U, Kondorosi E, Barlier I, Schell J, John M. 1994. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: rhizobium NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 3122-3126.

Rolfe BG, Batley M, Redmond JW, Richardson AE, Simpson RJ, Bassam BJ, Sargent CL, Weinman JJ, Djordjevic MA, Dazzo FB. 1988. Phenolic compounds secreted by legumes. In "Nitrogen fixation : hundred years after" (Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE, eds), Gustav Fischer, Stuttgart, Germany, pp. 405-409.

Rossen L, Shearman C, Johnston A, Downie J. 1985. The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA*, *B*, *C* genes. *EMBO Journal* 4, 3369-3373.

-S-

Saier MHJ, Tam R, Reizer A, Reizer J. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular Microbiology* 11, 841-847.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 484-486.

Samba RT, De Lajudie P, Gillis M, Neyra M, Spencer-Baretto MM, Dreyfus B. 1999. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. *Symbiosis* 27, 259-268.

Sambrook J, Fristch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New-York. USA.

Sandanam S, Jayasooriya SG, Somoratne A. 1976. Effect of soil reconditionning on organic matter and nutrient status of tea soils and yield of planted tea. *Journal of Plantation* 4, 60-67.

Sano ZI, Nakasano KC, Araki M. 1983. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in some enemy and host plants. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu* 29, 132-136.

Schlaman H, Horvath B, Vijgenboom E, Okker R, Lugtenberg B. 1991. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Journal of Bacteriology* 173, 4277-4287.

Schlaman HRM, Phillips DA, Kondorosi E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. in *The Rhizobiaceae*, H.P. Spaink, Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J., Editors. Kluwer academic publishers: Dordrecht, The Netherlands, pp. 361-386.

Schultze M, Kondorosi A. 1996. The role of Nod signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12,137-149.

Schulze J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 125-137.

Sellami SM, Mouffarraah A. 1994. Effect of some aqueous plant extracts on juvenile hatching and larval mortality against *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen – Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent* 59, 813-816.

Senthilkumar M, Madhaiyan M, Sundaram S, Kannaiyan, S. 2007. Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). *Microbiological Research*.

Serpantié G, Floret C. 1994. Un mode de gestion des ressources en Afrique tropicale : la jachère longue, regards différenciés sur une pratique en crise. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 80, 75-83.

Settings M. 2005. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 15, 2453-2455.

Sharma RD, Scolari DDG. 1984. Efficiency of green manure and crop rotation in the control of nematodes under savannah conditions. *Nematologia Brasileira* 8, 193-251.

Shirley BW. 1996. Flavonoid biosynthesis : ‘New’ functions for an ‘old’ pathway. *Trends in Plant Science* 1, 377-382.

- Silva GS**, Ferraz S, Santos JMD. 1989a. Resistance of *Crotalaria* species to *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaei*. *Nematologica Brasileira* 13, 81-86.
- Silva GS**, Ferraz S, Santos JM. 1989b. Resistance of *Crotalaria* species to *Rotylenchus reniformis*. *Nematologica Brasileira* 13, 87-92.
- Silva GS**, Ferraz S, Santos JM. 1990a. Histopathology of *Crotalaria* roots infested with *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 15, 46-47.
- Silva GS**, Ferraz S, Santos JM. 1990b. Effect of *Crotalaria* spp. on *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* race 3 and *Meloidogyne exigua*. *Fitopatologia Brasileira* 15, 94-95.
- Simon R**, Priefer U, Puhler A. 1983. A broad host mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1, 784-790.
- Skerman VBD**, MacGowan V, Sneath PHA. 1980. Approved list of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 225-420.
- Smit G**, Puvanesarajah V, Carlson R, Barbour W, Stacey G. 1992. *Bradyrhizobium japonicum nodDI* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. *Journal of Biological Chemistry* 267, 310-318.
- Somasegaran P**, Hoben HJ. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. MIRCEN, ed. NIIFTAL. Maui: University of Hawaii Press.
- Souleimanov A**, Prithiviraj B, Smith DL. 2002. The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *Journal of Experimental Botany* 53, 1929-1934.
- Spaink HP**. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Molecular Biology* 20, 977-986.
- Spaink HP**. 1996. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15, 559-582.
- Spaink HP**. 2000. Root nodulation and infection produced by rhizobial bacteria. *Annual Review in Biochemistry* 54, 257-288.
- Spaink HP**, Sheeley DM, Van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 354, 125-130.
- Spaink HP**, Wijffjes AH, Van der Drift K, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Lutenberg BJ. 1994. Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology* 13, 821-31.
- Sprent J**, Raven PH. 1992. Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. in *Biological nitrogen fixation*. London: Chapman and Hall.

- Sprent J.** 1993. Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants ? In New horizons in nitrogen fixation, R. Palacios, Mora, J., and Newton, W.E., Editors. Kluwer: Dordrecht.
- Stacey G**, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, May GD. 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 110-121.
- Stacey G**, Luka S, Sanjuan J, Banfalvi Z, Nieuwkoop AJ, Chun JY, Forsberg LS, Carlson RW. 1994. *NodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 176, 620-633.
- Stepkowski T**, Hughes CE, Law IJ, Markiewicz L, Gurda D, Chlebicka A, Moulin L. 2007. Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Applied in Environmental Microbiology* 73, 3254-3264.
- Stepkowski T**, Moulin L, Krzyzanska A, MacInnes A, Law IJ, Howieson J. 2005. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Applied in Environmental Microbiology* 71, 7041-7052.
- Stokkermans TJ**, Ikeshita S, Cohn J, Carlson RW, Stacey G, Ogawa T, Peters NK. 1995. Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on soja. *Plant Physiology* 108, 1587-1595.
- Stougaard J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology* 124, 531-540.
- Stracke S**, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417, 959-962.
- Subramanian S**, Nagarajan S. 1967. Chemical components of the seeds of *Crotalaria verrucosa*. *Indian Journal of Pharmacy*.
- Subramanian S**, Nagarajan S. 1967. Isovitexin from the seeds of *Crotalaria anagyroides*. *Current Science*.
- Subramanian S**, Nagarajan S. 1968. Phytochemical studies on *Crotalaria laburnifolia*. *Planta Medica*.
- Subramanian S**, Nagarajan S. 1969. Flavonoids of seeds of *Crotalaria retusa* and *C. striata*. *Current Science* 38, 65.
- Subramanian S**, Nagarajan S. 1970. Flavonoids of three *Crotalaria* species. *Phytochemistry*.
- Subramaniyan S**, Vadivelu S. 1990. Effects of *Crotalaria spectabilis* on *Meloidogyne incognita*. *International Nematology Network Newsletter* 7, 8-9.
- Subramanian S**, Stacey G, Yu O. 2006. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Journal*

48, 261-73.

Suominen L, Luukkainen R, Roos C, Lindstro K. 2003. Activation of the *nodA* promoter by the *nodD* genes of *Rhizobium galegae* induced by synthetic flavonoids or *Galega orientalis* root exudates. FEMS Microbiology Letters 219, 225-232.

Swofford DL. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Sy A. 2001. Caractérisation de *Methylobacterium nodulans* : une nouvelle espèce bactérienne nodulant les crotalaires. Doctorat de l'Université Montpellier II. Formation doctorale: développement et adaptation des plantes. Ecole doctorale: Biologie intégrative.

Sy A. 1995. Etude de trente quatre légumineuses herbacées du Sénégal : germination des graines et caractérisation de leurs microorganismes symbiotiques. DEA. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Département Biologie Végétale université de Dakar. 52 pages.

Sy A, Danthu P, Grouzis M. 1997. Réhabilitation des terres dégradées au nord et au sud du Sahara. Utilisation des légumineuses pérennes et des microorganismes associés pour l'établissement de formations pluristrates. Projet CEE STD3-TS3/DG XII. Rapport final. pp 104-113.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, De Lajudie P, Prin Y, Neyra M., Gillis M, Masson-Boivin C, Dreyfus B. 2001a. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of Bacteriology 183, 214-220.

Sy A, Giraud E, Samba R, De Lajudie P, Gillis M, Dreyfus B. 2001b. Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. Canadian Journal of Microbiology 47, 503-508.

Sy A, Timmers A, Knief C, Vorholt J. 2005. Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. Applied and Environmental Microbiology 71, 7245-7252.

-T-

Tan ZY, Wang ET, Peng GX, Zhu ME, Martinez-Romero E, Chen WX. 1999. Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 1457-1469.

Taylor LP, Grotewold E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology 8, 317-323.

Terefework Z, Nick G, Suomalainen S, Paulin L, Lindstrom K. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 349-356.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24, 4876-4882.

Timmers A. 1998. Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* 125, 339-349.

Treilhou M, Ferro M, Monteiro C, Poinot V, Jabbouri S, Kanony C, Promé D, Promé JC. 2000. Differentiation of *O*-acetyl and *O*-carbamoyl esters of N-acetyl-glucosamine by decomposition of their oxonium ions. Application to the structure of the nonreducing terminal residue of Nod factors. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11, 301-311.

Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, de Billy F, Promé JC, Dénarié J. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351, 670 - 673

Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludena D, Mateos PF, Martinez-Molina E, Velasquez E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1318-1327.

-U-

Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. 2005. *Lotus japonicum*: legume research in the fast lane. *Trends in Plant Science* 10, 222-228.

Urakami T, Araki H, Suzuki KI, Komagata K. 1993. Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 504-513.

-V-

Valverde A, Velázquez E, Fernández-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Igual JM, Willems A. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1985-1989.

Van Aken B, Peres C, Doty S, Yoon J, Schnoor J. 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1191-1196.

Van Brussel AAN, Bakhuizen R, Van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lutenberg BJJ, Kijne JW. 1990. A biovar specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exsudate of *Vicia sativa* susp. Nigra. *Journal of Bacteriology* 172, 5394-5401.

Van Brussel AAN, Bakhuizen R, Van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lutenberg BJJ, Kijne JW. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257, 70.

Van Der Drift KM, Spaink HP, Bloemberg GV, Van Brussel AA, Lugtenberg BJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE. 1996. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* produces lipo-chitin oligosaccharides with *nodE*-dependent highly unsaturated fatty acyl moieties. *An*

electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometric study. *Journal of Biological Chemistry* 271, 22563-22569.

Van Rhijn P, Desair J, Vlassak K, Vanderleyden J. 1994. The NodD proteins of *Rhizobium* sp. strain BR816 differ in their interactions with coinducers and in their activities for nodulation of different host plants. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3615-3623.

Van Rhijn P, Vanderleyden J. 1995. The *Rhizobium* plant symbiosis. *Microbiological Review* 59, 124-142.

Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* 172, 4295-306.

Vassileva V, Ignatov G. 2002. Relationship between bacteroid poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nodule functioning in the *Galega orientalis*-*Rhizobium galegae* symbiosis under diamine treatment. *Physiologia Plantarum* 114, 27-32.

Vazquez M, Santana O, Quinto C. 1993. The NodL and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains are similar to capsular polysaccharide secretion proteins from gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 8, 369-377.

Verdcourt B, Trump EC. 1969. Common poisonous plants of east Africa. Collins, London, England.

Verpoorte R, Van Der Heijden R, Ten Hoopen HJG, Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology letters* 21, 467-479.

Villar EMJ, Zavaleta-Mejia E. 1990. Effect of *Crotalaria longirostrata* on root galling nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Revista Mexicana de Fitopatologia* 2, 166-172.

Vincent JM. 1970. A manual for practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.

-W-

Waelkens F, Voets T, Vlassak K, Vanderleyden J, Van Rhijn P. 1995. The *nodS* gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 147-154.

Wagner H, Bladt S. 1996. Plant Drug Analysis ; A thin layer chromatography atlas. 2nd édition, Springer, Berlin, 384 pages.

Wais RJ, Galera C, Oldroyd G, Catoira R, Penmesta RV, Cook D, Gough C, Dénarié J, Long SR. 2000. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 13407-13412.

Wais RJ, Keating DH, Long SR. 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology* 129, 211-224.

Wang KH, Sipes BS, Schmitt DP. 2002. *Crotalaria* as cover crop for nematode management: a review. *Nematropica* 32, 35-57.

Wang X, Sahr F, Xue T, Sun B. 2007. *Methylobacterium salsuginis* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1699.

Wang Y, Zhang Z. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* 146, 2845-2854.

Wanjala CCW, Majinda, RRT. 1999. Flavonoid glycosides from *Crotalaria podocarpa*. *Phytochemistry* 51, 705-707.

Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. 1962. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. In: Being an account of their medicinal and other uses, chemical composition, pharmacological effects and toxicology in man and animal, 2nd edn. E & S Livingstone Ltd, Edinburgh, UK. 1457 pages

Willette RE, Cammarato LV. 1972. Phytochemical survey of Connecticut. I. Isolation of monocrotaline from *Crotalaria sagittalis* fruit. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61, 122.

Wilson JK. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. The *leguminosae*, a source book of characteristic, uses and nodulation. the university of Wisconsin Press, Madison, 812 pages.

Wilson JK. 1944. The nodulation performance of isolates from soybean with species of *Crotalaria* and certain other plants. The *leguminosae*, a source book of characteristic, uses and nodulation. the university of Wisconsin Press, Madison, 812 pages.

Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126, 485-493.

Woo HH, Kuleck G, Hirsch AM, Hawes MC. 2002. Flavonoids : signal molecules in plant development. In « Flavonoids in cell function » (B. Buslig and J. Manthey, eds.), Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 51-60.

Wood AP, Kelly DP, MacDonald IR, Jordan SL, Morgan TD, Khan S, Murrel JC, Borodina E. 1998. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp.nov. capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Archives of Microbiology* 169, 148-158.

Wood P, Siddiqui IR. 1971. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry* 39, 418-428.

-Y-

Yadava RN. 1993. A novel flavone glycoside from the seeds of *Crotalaria laburnifolia* Linn. *Journal of the Indian Chemical Society* 70, 273-274.

Yadava R, Mathews S. 1994. A novel flavonol glycoside from *Crotalaria verrucosa*.

Fitoterapia 65, 340-342.

Yang GP, Debéllé F, Savagnac A, Ferro M, Schiltz O, Maillet F, Promé D, Treilhou M. 1999. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with $\alpha\beta$ -unsaturated N-acyl substitutions. *Molecular Microbiology* 34, 227-237.

Yates RJ, Howieson JG, Reeve WG, Nandasena KG, Law IJ, Bräu L, Ardley JK, Nistelberger HM, Real D, O'Hara GW. 2007. *Lotononis angolensis* forms nitrogen fixing, lupinoid nodules with phylogenetically unique, fast-growing, pink-pigmented bacteria, which do not nodulate *L. bainesii* or *L. listii*. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1680-1688.

Yoo H, Lee J, Kim C, Kim J. 2004. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora*. *Archive of Pharmaceutical Research* 27, 544-546.

Yoshimura F. 1982. Phylloplane bacteria in pine forest. *Canadian Journal of Bacteriology* 28, 580-592.

You Z, Marutani M, Borthakur D. 2002. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. *Journal of Applied Microbiology* 93, 577-584.

Young JPW. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen fixing-organisms. *Biological Nitrogen Fixation*, ed. G. Stacey, Burris, R.H., and Evans, H.J., Chapman & Hall: New York, pp. 43-86.

Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* : A reply to Farrand et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 169, 198-204.

-Z-

Zaat SAJ, Schripsema J, Wijffelman CA, Van Brussel AAN, Lugtenberg BJJ. 1989. Analysis of the major inducer of *Rhizobium nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nodD* genes. *Plant Molecular Biology* 13, 175-188.

Zaat S, Wijffelman C, Spaink H, Van Brussel A, Okker R, Lugtenberg B. 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *Journal of Bacteriology* 169, 198-204.

Zabetakis I . 1997. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50, 179-183.

Zahran HH. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* 91, 143-153.

Zedan IZ. 1994. Further constituents of *Crotalaria thebaica* (Del.) Bulletin of the Faculty of Science, Assiut University, B: Chemistry 23, 49-68.

Zhang H, Prithiviraj B, Souleimanov A, D'Aoust F, Charles TC, Driscoll BT, Smith DL, 1996. The effect of temperature and genistein concentration on lipo-chitooligosaccharide (LCO) production by wild-type and mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Soil Biology and Biochemistry 34, 1175-1180.

Zuanazzi S. 1998. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. Molecular Plant-Microbe Interactions 11, 784-794.

Zurdo-Piñeiro JL, Rivas R, Trujillo ME, Vizcaíno N, Carrasco JA, Chamber M, Palomares A, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 784-788.

RESUME

La symbiose *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* est une symbiose originale. En effet, la méthylotrophie, propriété remarquable de la bactérie, s'exprime à l'apex du nodule et modifie localement le métabolisme : une dégradation apicale marquée des tissus est observée suite à une digestion des parois végétales, libérant du méthanol directement utilisable par la bactérie. Grâce à ce métabolisme, le bactéroïde -de taille et de forme inhabituellement grandes- fournirait l'énergie nécessaire à l'activité de la nitrogénase, et permettrait à la plante d'accumuler des réserves carbonées sous forme d'amyloplastés dans les cellules infectées. Cette propriété méthylotrophique bactérienne apporte également à la plante-hôte un gain de biomasse (>40 % par rapport aux mutants non méthylotrophes). En revanche, à l'échelle de l'espèce, la crotalaire n'est pas avantagée, en termes de fixation d'azote, à s'associer avec *M. nodulans* ou avec *Bradyrhizobium* sp., autre genre bactérien décrit en symbiose avec ces plantes. L'originalité de cette association symbiotique se situe également au niveau du dialogue moléculaire : les gènes *nod* de *M. nodulans* sont insensibles aux isoflavones, flavonoïdes inducteurs des *Bradyrhizobium*, mais sont induits par les flavanones et les flavones. L'analyse phylogénétique des gènes *nod* révèle que *M. nodulans* forme une branche particulière avec *Methylobacterium* sp. 4-46 et *Burkholderia tuberum* STM678, isolées de nodules de Légumineuses appartenant à la tribu des *Crotalariae*. Au niveau du signal bactérien, une structure unique de facteur Nod a été caractérisée chez *M. nodulans* ORS2060^T : MnV(C_{18:1}, S). Enfin, si la symbiose fonctionnelle *M. nodulans*/ *Crotalaria* a été identifiée seulement chez trois espèces de plante, la capacité du partenaire bactérien à former des pseudonodules avec d'autres *Crotalaria* laisse entrevoir un rôle clé de plusieurs composés pendant le processus d'infection suggérant différents mécanismes moléculaires impliqués dans la spécificité d'hôte.

TITLE : Multidisciplinary approach of the *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* symbiosis

ABSTRACT

The *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* interaction is an original symbiosis. First, major metabolic modifications in the nodule will take place due to bacterial methylophilic property located at the nodule apex: a significant apical degradation was observed after cell wall digestion, with free methanol emission, directly available for the bacterium. The bacteroid (size and form unusually large) provides the useful energy to nitrogenase activity, allowing the plant to accumulate organic compounds inside infected cells in amyloplasts. In addition, the bacterial methylophilic property contributes to plant biomass benefit (40% higher when compared to non methylophilic mutants). However, any *Crotalaria* species take advantage in terms of nitrogen fixation to be combined with either *M. nodulans* or *Bradyrhizobium* sp., the latter bacterial genus being commonly associated with *Crotalaria* sp. The feature of the symbiosis is also original due to molecular interactions: *M. nodulans* *nod* genes are insensitive to *Bradyrhizobium* flavonoid inducers (isoflavones) but are inducible by flavanones and flavones. The phylogenetic analysis of identified *nod* genes shows that *M. nodulans* belongs to the same branch as *Methylobacterium* sp. 4-46 and *Burkholderia tuberum* STM678, isolated from others species belonging to *Crotalariae* tribe. A new Nod factor was identified as a bacterial signal as follows MnV(C_{18:1}, S). Thus, if the specific *M. nodulans* – plant interaction was only reported for three *Crotalaria* species, the bacterium capacity to form pseudonodules with different *Crotalaria* points out the major key role of other chemical key signals during the infection process and suggests various molecular mechanisms supporting the symbiotic specificity.

DISCIPLINE : Physiologie Végétale

MOTS-CLES : *Crotalaria*, *Methylobacterium*, méthylotrophie, symbiose, flavonoïdes, facteurs Nod.

INTITULES ET ADRESSES DES LABORATOIRES DE RATTACHEMENT

- Institut de Recherche pour le Développement, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), UMR 113, Campus International de Baillarguet, TA-A82/J34398 Montpellier cedex 5, France.
- Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie (Université Montpellier 1), UMR 5175 CEFE, 15 avenue Charles Flahault, BP 14 491, 34093 Montpellier cedex 5, France.

RESUME

La symbiose *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* est une symbiose originale. En effet, la méthylotrophie, propriété remarquable de la bactérie, s'exprime à l'apex du nodule et modifie localement le métabolisme : une dégradation apicale marquée des tissus est observée suite à une digestion des parois végétales, libérant du méthanol directement utilisable par la bactérie. Grâce à ce métabolisme, le bactéroïde -de taille et de forme inhabituellement grandes- fournirait l'énergie nécessaire à l'activité de la nitrogénase, et permettrait à la plante d'accumuler des réserves carbonées sous forme d'amyloplastés dans les cellules infectées. Cette propriété méthylotrophique bactérienne apporte également à la plante-hôte un gain de biomasse (>40 % par rapport aux mutants non méthylotrophes). En revanche, à l'échelle de l'espèce, la crotalaire n'est pas avantagée, en termes de fixation d'azote, à s'associer avec *M. nodulans* ou avec *Bradyrhizobium* sp., autre genre bactérien décrit en symbiose avec ces plantes. L'originalité de cette association symbiotique se situe également au niveau du dialogue moléculaire : les gènes *nod* de *M. nodulans* sont insensibles aux isoflavones, flavonoïdes inducteurs des *Bradyrhizobium*, mais sont induits par les flavanones et les flavones. L'analyse phylogénétique des gènes *nod* révèle que *M. nodulans* forme une branche particulière avec *Methylobacterium* sp. 4-46 et *Burkholderia tuberum* STM678, isolées de nodules de Légumineuses appartenant à la tribu des *Crotalariae*. Au niveau du signal bactérien, une structure unique de facteur Nod a été caractérisée chez *M. nodulans* ORS2060^T : MnV(C_{18:1}, S). Enfin, si la symbiose fonctionnelle *M. nodulans*/ *Crotalaria* a été identifiée seulement chez trois espèces de plante, la capacité du partenaire bactérien à former des pseudonodules avec d'autres *Crotalaria* laisse entrevoir un rôle clé de plusieurs composés pendant le processus d'infection suggérant différents mécanismes moléculaires impliqués dans la spécificité d'hôte.

TITLE : Multidisciplinary approach of the *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* symbiosis

ABSTRACT

The *Methylobacterium nodulans* / *Crotalaria podocarpa* interaction is an original symbiosis. First, major metabolic modifications in the nodule will take place due to bacterial methylophilic property located at the nodule apex: a significant apical degradation was observed after cell wall digestion, with free methanol emission, directly available for the bacterium. The bacteroid (size and form unusually large) provides the useful energy to nitrogenase activity, allowing the plant to accumulate organic compounds inside infected cells in amyloplasts. In addition, the bacterial methylophilic property contributes to plant biomass benefit (40% higher when compared to non methylophilic mutants). However, any *Crotalaria* species take advantage in terms of nitrogen fixation to be combined with either *M. nodulans* or *Bradyrhizobium* sp., the latter bacterial genus being commonly associated with *Crotalaria* sp. The feature of the symbiosis is also original due to molecular interactions: *M. nodulans* *nod* genes are insensitive to *Bradyrhizobium* flavonoid inducers (isoflavones) but are inducible by flavanones and flavones. The phylogenetic analysis of identified *nod* genes shows that *M. nodulans* belongs to the same branch as *Methylobacterium* sp. 4-46 and *Burkholderia tuberum* STM678, isolated from others species belonging to *Crotalariae* tribe. A new Nod factor was identified as a bacterial signal as follows MnV(C_{18:1}, S). Thus, if the specific *M. nodulans* – plant interaction was only reported for three *Crotalaria* species, the bacterium capacity to form pseudonodules with different *Crotalaria* points out the major key role of other chemical key signals during the infection process and suggests various molecular mechanisms supporting the symbiotic specificity.

DISCIPLINE : Physiologie Végétale

MOTS-CLES : *Crotalaria*, *Methylobacterium*, méthylotrophie, symbiose, flavonoïdes, facteurs Nod.

INTITULES ET ADRESSES DES LABORATOIRES DE RATTACHEMENT

- Institut de Recherche pour le Développement, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), UMR 113, Campus International de Baillarguet, TA-A82/J34398 Montpellier cedex 5, France.
- Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie (Université Montpellier 1), UMR 5175 CEFE, 15 avenue Charles Flahault, BP 14 491, 34093 Montpellier cedex 5, France.